

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
6. Dezember 2001 (06.12.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 01/92566 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12Q 1/68 (81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/06014
- (22) Internationales Anmeldedatum:  
25. Mai 2001 (25.05.2001)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:  
100 26 300.3 26. Mai 2000 (26.05.2000) DE
- (71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): NOXXON PHARMA AG [DE/DE]; Gustav-Meyer-Allee 25, 13355 Berlin (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): BURMEISTER, Jens [DE/DE]; Weddingstr. 5, 13357 Berlin (DE). BURGSTALLER, Petra [DE/DE]; Baseler Strasse 142, 12205 Berlin (DE). KLÜSSMANN, Sven [DE/DE]; Paulsbomer Strasse 83 A, 10709 Berlin (DE). KLEIN, Thomas [DE/DE]; Philipp-Franck-Weg 9, 14109 Berlin (DE). FRAUENDORF, Christian [DE/DE]; Granitzstr. 6a, 13189 Berlin (DE).
- (74) Anwalt: BOHMANN, Armin, K.; Bohmann & Loosen, Sonnenstrasse 8, 80331 München (DE).
- (84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts
- mit dem Sequenzprotokollteil der Beschreibung in elektronischer Form getrennt veröffentlicht; auf Antrag vom Internationalen Büro erhältlich

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: IMMOBILIZED NUCLEIC ACIDS AND USES THEREOF

(54) Bezeichnung: IMMOBILISIERTE NUKLEINSÄUREN UND VERWENDUNGEN DAVON

(57) Abstract: One aspect of the invention relates to an immobilized nucleic acid comprising a nucleic acid and a matrix. The nucleic acid is a Spiegelmer. The Spiegelmer is functionally active. Another aspect of the invention relates to an immobilized nucleic acid and a matrix. Said nucleic acid is coupled to the matrix via end 3' and the nucleic acid is a functional nucleic acid. The invention further relates to the use of said immobilized nucleic acids as affinity ligands in chromatography and apheresis, for example.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft in einem Aspekt eine immobilisierte Nukleinsäure umfassend eine Nukleinsäure und eine Matrix, wobei die Nukleinsäure ein Spiegelmer ist und das Spiegelmer funktional aktiv ist. In einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung eine immobilisierte Nukleinsäure umfassend eine Nukleinsäure und eine Matrix, wobei die Nukleinsäure zumindest über ihr 3'-Ende an die Matrix gekoppelt ist und die Nukleinsäure eine funktionale Nukleinsäure ist. Schließlich betrifft die Erfindung in einem weiteren Aspekt die Verwendung derartiger immobilisierter Nukleinsäuren als Affinitätsliganden beispielsweise in der Chromatographie und in der Apherese.

WO 01/92566 A2

## Immobilisierte Nukleinsäuren und Verwendungen davon

## Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft immobilisierte Nukleinsäuren, deren Verwendung zur Apherese und Affinitätsreinigung, eine diese enthaltende Apheresevorrichtung und Verfahren zu deren Herstellung.

Die Apherese oder Plasmapherese stellt zum einen ein präparatives Verfahren zur Gewinnung von Spenderplasma und bestimmten Blutzellen und zum anderen ein therapeutisches Verfahren dar, bei dem insbesondere spezifische Plasmabestandteile entfernt werden. Die Apherese findet bspw. Anwendung als LDL-Apherese bei familiärer Hypercholesterinämie, Lipidapherese, Immunapherese zur Entfernung von Autoantikörpern und Zytapherese zur Abtrennung von Erythro- oder Leukozyten.

Das Ziel insbesondere der therapeutischen Apherese ist allgemein die Bindung unerwünschter Moleküle aus dem Blut an eine Adsorbersäule außerhalb des Körpers zur Verbesserung eines bestimmten Krankheitsbildes. Der Vorteil der Apherese im Gegensatz zur Applikation von Wirkstoffen in den Organismus besteht darin, dass weniger Nebenwirkungen auftreten.

Ein Beispiel für im Rahmen der Apherese, aber auch im Rahmen einer Affinitätsreinigung verwendete funktionale Liganden sind Antikörper, Proteine oder Peptide, die spezifisch oder unspezifisch auf Trägermaterialien immobilisiert werden und für die Apherese schon seit vielen Jahren eingesetzt werden. Die Adsorbersäule kann dann an eine Plasmatrennmaschine für die Plasmapherese oder im Fall der Vollblutreinigung unter Verwendung einer geeigneten anderen festen Phase direkt in den extrakorporalen Blutstrom des Patienten geschaltet werden. Das Blut wird so über die Adsorbersäule geführt, dass die schädlichen Substanzen bzw. Moleküle auf der Adsorbersäule durch die Wechselwirkung mit den immobilisierten Liganden festgehalten werden. Das solchermaßen gereinigte Serum oder Blut wird dann wieder in den Körper des Patienten zurückgeführt.

Die Schwierigkeiten bei der Entwicklung von Apheresesystemen bestehen in dem Auffinden und der Herstellung eines geeigneten Affinitätsliganden, dessen nativer Immobilisierung, d.h. unter Beibehaltung seiner relevanten Bindungscharakteristiken, an eine in der Regel feste Phase, so

dass er während und nach dem Herstellungsprozess funktional bleibt. Vorzugsweise sollte der Ligand sterilisierbar, möglichst dampfsterilisierbar sein. Darüber hinaus muss eine wesentliche Eigenschaft des Liganden seine Stabilität in der Umgebung von Serum bzw. Vollblut sein, d. h. er muss unter den Apheresebedingungen eine genügend lange Halbwertszeit gegenüber den in Serum bzw. Blut vorhandenen abbauenden Enzymen aufweisen.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es somit, einen insbesondere in der Apherese einsetzbaren Liganden zu finden, der den obigen Anforderungen genügt. Eine weitere Aufgabe besteht darin, ein Affinitätssystem und insbesondere ein Apheresesystem bereitzustellen, das eine hochspezifische Entfernung bestimmter in einem Fluid und insbesondere Blut oder Serum vorhandener Stoffen erlaubt und gleichzeitig die oben genannten Nachteile und Unzulänglichkeiten der im Stand der Technik bekannten Affinitätsliganden und Apheresesysteme überwindet.

Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein Verfahren bereitzustellen, welches das Auflösen des Komplexes aus funktionaler Nukleinsäure und Zielmolekül erlaubt, insbesondere, wenn die funktionale Nukleinsäure an eine Matrix oder einen festen Träger, was hierin synonym verwendet wird, gebunden oder immobilisiert ist.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe gelöst durch eine immobilisierte Nukleinsäure umfassend eine Nukleinsäure und eine Matrix, wobei die Nukleinsäure ein Spiegelmer ist und das Spiegelmer funktional aktiv ist.

In einer Ausführungsform ist vorgesehen, dass das Spiegelmer über sein 3'-Ende an die Matrix gebunden ist

In einer weiteren Ausführungsform ist vorgesehen, dass das Spiegelmer über sein 5'-Ende an die Matrix gebunden ist.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe weiter gelöst durch eine immobilisierte Nukleinsäure, die eine Nukleinsäure und eine Matrix umfasst, wobei die Nukleinsäure über ihr 3'-Ende an die Matrix gebunden ist. Besonders bevorzugt ist dabei, wenn die Nukleinsäure eine funktionale Nukleinsäure ist.

Weiterhin wird die Aufgabe erfindungsgemäß gelöst durch die Verwendung der erfindungsgemäßen immobilisierten Nukleinsäuren als Affinitätsmedium, insbesondere als Affinitätsmedium in der Affinitätsreinigung und bevorzugterweise in der Affinitätschromatographie.

In einem weiteren Aspekt wird die Aufgabe gelöst durch die Verwendung der erfindungsgemäßen immobilisierten Nukleinsäure zur Apherese, d.h. zur extrakorporalen Blutreinigung.

Des weiteren wird die Aufgabe gelöst durch eine Apheresevorrichtung, die die erfindungsgemäße immobilisierte Nukleinsäure umfasst.

Schließlich wird die Aufgabe gelöst durch ein Verfahren zur Herstellung einer immobilisierten Nukleinsäure, insbesondere zur Herstellung der erfindungsgemäßen immobilisierten Nukleinsäure, das die folgenden Schritte umfasst:

- Bereitstellen einer Nukleinsäure und einer Matrix, und
- Umsetzen der Nukleinsäure und der Matrix zur Ausbildung einer Bindung des 3'-Endes und/oder des 5'-Endes der Nukleinsäure an die Matrix.

Die Aufgabe wird alternativ auch durch ein Verfahren gelöst, das die folgenden Schritte umfasst:

- Bereitstellen einer Nukleinsäure und einer Matrix, und
- Umsetzen der Nukleinsäure und der Matrix zur Ausbildung einer Bindung des 3'-Endes und 5'-Endes der Nukleinsäure an die Matrix

Weiterhin wird die Aufgabe erfindungsgemäß gelöst durch ein Verfahren zur Elution eines an eine Nukleinsäure, insbesondere an eine erfindungsgemäße immobilisierte Nukleinsäure, gebundenen Zielmoleküls, wobei die Elution unter Verwendung von destilliertem Wasser bei

erhöhter Temperatur erfolgt. Bevorzugterweise beträgt die erhöhte Temperatur mindestens 45°C, bevorzugterweise mindestens 50°C und noch bevorzugterweise mindestens 55°C.

In einem noch weiteren Aspekt wird die Aufgabe gelöst durch ein Verfahren zur Elution eines an eine erfindungsgemäße immobilisierte Nukleinsäure gebundenen Zielmoleküls, wobei die Elution eine denaturierende Elution ist.

In einer Ausführungsform ist vorgesehen, dass die denaturierende Elution unter Verwendung einer Verbindung erfolgt, wobei die Verbindung ausgewählt ist aus der Gruppe, die Guanidiniumthiocyanat, Harnstoff, Guanidiniumhydrochlorid, Ethylendiamintetraacetat, Natriumhydroxid, und Kaliumhydroxid

In einer Ausführungsform der erfindungsgemäßen immobilisierten Nukleinsäure ist vorgesehen, dass die funktionale Nukleinsäure ausgewählt ist aus der Gruppe, die Aptamere umfasst.

In einer weiteren Ausführungsform der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren ist vorgesehen, dass die immobilisierte Nukleinsäure zusätzlich zur Bindung über ihr 3'-Ende oder ihr 5'-Ende über mindestens eine weitere Stelle an die Matrix gebunden ist. Bevorzugterweise ist die weitere Stelle das 5'-Ende der Nukleinsäure. Alternativ oder ergänzend kann vorgesehen sein, dass die weitere Stelle eine Stelle innerhalb der Sequenz der Nukleinsäure ist. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist vorgesehen, dass neben einer Bindung der Nukleinsäure an die Matrix über das 3'-Ende der Nukleinsäure auch eine Bindung über das 5'-Ende der Nukleinsäure und des weiteren über mindestens eine Stelle innerhalb der Sequenz der Nukleinsäure gebunden ist.

In einer bevorzugten Ausführungsform sind die erfindungsgemäßen immobilisierten Nukleinsäuren an ihrem 5'-Ende modifiziert.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfasst die Nukleinsäure Nukleotide, die ausgewählt sind aus der Gruppe, die D-Nukleotide, L-Nukleotide, modifizierte D-Nukleotide und modifizierte L-Nukleotide sowie Mischungen davon umfasst.

In einer Ausführungsform der erfindungsgemäßen immobilisierten Nukleinsäure ist die Nukleinsäure direkt an die Matrix gebunden.

In einer alternativen Ausführungsform der immobilisierten Nukleinsäure ist die Nukleinsäure über eine Linkerstruktur an die Matrix gebunden.

In einer Ausführungsform der erfindungsgemäßen immobilisierten Nukleinsäure ist die Linkerstruktur sowohl an das 3'- als auch das 5'-Ende der Nukleinsäure gebunden und die Linkerstruktur auch an die Matrix gebunden; dabei kommt es zur Ausbildung einer Y-förmigen Linkerstruktur.

In einer weiteren Ausführungsform ist die Linkerstruktur ein Spacer, wobei der Spacer bevorzugt mindestens 4 Atome umfasst, die ausgewählt sind aus der Gruppe, die C-Atome und Heteroatome umfasst.

In einer noch weiteren Ausführungsform ist die für die direkte oder indirekte Bindung der Nukleinsäure an die Matrix verwendete Struktur der Nukleinsäure ausgewählt aus der Gruppe, die den Zuckeranteil des Zucker-Phosphat-Rückgrats, den Phosphatteil des Zucker-Phosphat-Rückgrats und den Basenanteil der die Nukleinsäure ausbildenden Nukleotide umfasst.

Bei der erfindungsgemäßen immobilisierten Nukleinsäure kann vorgesehen sein, dass die Bindung ausgewählt ist aus der Gruppe, die kovalente Bindungen, nicht-kovalente Bindungen, insbesondere Wasserstoffbrückenbindungen, van der Waals-Wechselwirkungen, Coulomb-Wechselwirkungen und/oder hydrophobe Wechselwirkungen, koordinative Bindungen, und Kombinationen davon umfasst.

Weiterhin kann in einer Ausführungsform vorgesehen sein, dass die Matrix eine feste Phase oder ein fester Träger ist.

In einer bevorzugten Ausführungsform der immobilisierten Nukleinsäure ist vorgesehen, dass die feste Phase, Matrix oder der feste Träger ein Material umfasst, das aus der Gruppe ausgewählt ist, die organische und anorganische Polymere umfasst.

In einer weiteren Ausführungsform der erfindungsgemäßen immobilisierten Nukleinsäure ist vorgesehen, dass die Nukleinsäure eine Mindestlänge aufweist, wobei die Mindestlänge ausgewählt ist aus der Gruppe, die Mindestlängen von etwa 15 Nukleotiden, 20 Nukleotiden, 25 Nukleotiden, 30 Nukleotiden, 35 Nukleotiden, 40 Nukleotiden, 50 Nukleotiden, 60 Nukleotiden, 90 Nukleotiden und 100 Nukleotiden umfasst.

In einer weiteren Ausführungsform ist vorgesehen, dass die Matrix ausgewählt ist aus der Gruppe, die CPG, Sepharose, Agarose, Eupergit und Polystyrol umfasst.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist vorgesehen, dass die immobilisierte Nukleinsäure eine Nukleinsäuresequenz nach SEQ ID No. 2 umfasst.

Bei den erfindungsgemäßen Verfahren, insbesondere bei dem erfindungsgemäßen Verfahren, bei dem die Umsetzung der Nukleinsäure und der Matrix zur Ausbildung einer Bindung des 3'-Endes der Nukleinsäure an die Matrix erfolgt, kann vorgesehen sein, dass es weiterhin den Schritt umfasst:

- Modifizieren der Nukleinsäure an ihrem 5'-Ende vor der Umsetzung.

Des weiteren kann vorgesehen sein, dass die erfindungsgemäßen Verfahren und insbesondere das erfindungsgemäße Verfahren, bei dem die Umsetzung der Nukleinsäure und der Matrix zur Ausbildung einer Bindung des 3'-Endes der Nukleinsäure an die Matrix erfolgt, weiterhin den folgenden Schritt umfassen:

- Modifizieren der Nukleinsäure an ihrem 5'-Ende nach der Umsetzung.

Schließlich kann bei den erfindungsgemäßen Verfahren vorgesehen sein, dass vor dem Umsetzen der Nukleinsäure und der Matrix die Nukleinsäure und/oder die Matrix aktiviert wird.

Des weiteren kann bei den erfindungsgemäßen Verfahren vorgesehen sein, dass die Nukleinsäure und/oder die Matrix vor oder während der Umsetzung mit einer Linkerstruktur oder einem Teil davon oder einem Spacer versehen wird/werden. Dies gilt auch für den Fall, dass die Nukleinsäure an die Matrix mittels eines Y-förmigen Spacers oder einer Y-förmigen Linkerstruktur gebunden wird. Dabei kann bevorzugt sein, dass zuerst das 3'- und das 5'-Ende

der Nukleinsäure an die Linkerstruktur oder einen Teil davon gebunden wird und anschließend diese an die Matrix gebunden wird. Es ist jedoch auch im Rahmen der Erfindung, dass zuerst die Linkerstruktur oder ein Teil davon an die Matrix gebunden wird und anschließend daran das 3'- und das 5'-Ende der Nukleinsäure gebunden wird. Schließlich sind auch Zwischenstufen der beiden grundlegenden Verfahren möglich, d.h. binden eines Endes der Nukleinsäure an die Linkerstruktur oder einen Teil davon, danach Binden des solchermaßen gebildeten Komplexes an die Matrix und abschließendes Binden des noch nicht mit der Linkerstruktur oder einem Teil davon gebundenen Endes der Nukleinsäure an die Linkerstruktur oder einen Teil davon.

Der vorliegenden Erfindung liegt die überraschende Erkenntnis zugrunde, dass durch eine Bindung oder Kopplung einer Nukleinsäure an eine Matrix über das 3'-Ende der Nukleinsäure, sei es direkt oder indirekt, d.h. unter Verwendung einer Linkerstruktur oder eines spacers, ein Schutz der gebundenen oder immobilisierten Nukleinsäure (hierin auch als gekoppelte Nukleinsäure bezeichnet) gegen Enzyme, wie Nukleasen (Endonukleasen und 3'- und 5'-Exonukleasen) und insbesondere 3'-modifizierende Enzyme, ebenso wie Stabilität, insbesondere auch gegen erhöhte Temperaturen und Drücke und damit Stabilität unter den Bedingungen der Sterilisation und ganz besonders unter den Bedingungen der Dampfsterilisation, erreicht wird. Unter Stabilität soll hierin auch die Aufrechterhaltung von Struktur und Funktion der immobilisierten funktionalen Nukleinsäure unter den Bedingungen der Apherese gemeint sein; dieses betrifft die biologische Stabilität der funktionalen und immobilisierten Nukleinsäure gegen abbauende Enzyme. Darüber hinaus gewährleistet die Immobilisierung der Nukleinsäure auch deren Schutz gegenüber unspezifischer Hydrolyse bei Lagerung. Diese infolge der Bindung der Nukleinsäure über zumindest ihr 3'-Ende an die Matrix erhöhte Stabilität, verglichen mit anderen Formen der Immobilisierung, äußert sich in einer erhöhten Halbwertszeit, die definiert ist als der Umfang der Veränderung einer Eigenschaft der Nukleinsäure über die Zeit. Derartige Eigenschaften können u.a. sein: Menge der gebundenen Nukleinsäure (bspw. pro Matrixoberfläche), Bindungseigenschaften für target-Moleküle und dergleichen.

Handelt es sich bei der gekoppelten Nukleinsäure um eine funktionale Nukleinsäure, treten die oben geschilderten Effekte ebenso auf. Dabei ist beachtlich, dass durch die Art der Immobilisierung bzw. Bindung vermittelt des 3'-Endes der Nukleinsäure neben der Stabilität der Nukleinsäure auch die Funktionalität der Nukleinsäure beibehalten wird, auch gegenüber den



vorstehend angeführten Enzymaktivitäten und den Bedingungen der Sterilisation, insbesondere der Dampfsterilisation.

Die Bindungsfähigkeit der immobilisierten Nukleinsäure, insbesondere wenn es sich dabei um eine funktionale Nukleinsäure handelt, für ein Zielmolekül oder einen Wechselwirkungspartner, ist insoweit überraschend, als dass das Bindungsverhalten der funktionalen Nukleinsäuren grundsätzlich verschieden ist von dem im Stand der Technik bekannten Binden von Nukleinsäuren an andere Nukleinsäuren über Basen-Basen-Wechselwirkungen. Die Bindung zwischen funktionalen Nukleinsäuren und ihrem Target oder ihrer Zielstruktur bzw. ihrem Zielmolekül erfordert die Ausbildung einer distinkten zwei- und dreidimensionalen Struktur und damit von Bindungstaschen. Darüber hinaus scheint es so zu sein, dass funktionale Nukleinsäuren wie Aptamere und Spiegelmere über den als „induced fit“ bekannten Mechanismus binden (Westhof, E. & Patel, D. (1997) *Curr Opin Struct Biol* 7, 305-309), d.h. die in der Lösung vorhandene Struktur der funktionalen Nukleinsäure verschieden ist von der Struktur der funktionalen Nukleinsäure im Komplex aus Zielmolekül und funktionaler Nukleinsäure. Vollkommen überraschend konnte nun festgestellt werden, dass auch bei Immobilisierung der funktionalen Nukleinsäure dieser Faltungsmechanismus der funktionalen Nukleinsäure, wie er Voraussetzung für die Ausbildung des besagten Komplexes ist, erfolgen kann.

Die vorstehenden überraschenden Eigenschaften einer solchermaßen gebundenen bzw. immobilisierten Nukleinsäure werden auch beobachtet, wenn neben der Kopplung mittels des 3'-Endes der Nukleinsäure zusätzlich eine Kopplung der Nukleinsäure über das 5'-Ende erfolgt, wobei es hinsichtlich des Kopplungsverfahrens möglich ist, dass zuerst das 5'-Ende und danach das 3'-Ende, oder zuerst das 3'-Ende und danach das 5'-Ende oder beide Enden gleichzeitig immobilisiert werden (M. Kwiatkowski et al., *Nucl. Acids Res.* 1999, 27, 4710-4714). Gleiches gilt auch für die Situation, dass neben der Bindung der Nukleinsäure an die Matrix über das 3'-Ende der Nukleinsäure und gleichzeitig über das 5'-Ende noch zumindest eine weitere Stelle der Nukleinsäure für die Bindung derselben an die Matrix verwendet wird. Eine derartige weitere Stelle ist jene, die in der Sequenz der Nukleinsäure, d.h. der Abfolge der Nukleotide, enthalten ist. Es ist somit im Umfang der vorliegenden Erfindung, dass auch die Nukleotide innerhalb der immobilisierten oder zu immobilisierenden Nukleinsäure für eine Bindung der Nukleinsäure an die Matrix verwendet werden. Dabei ist es wie im Falle der Immobilisierung bzw. Bindung der

Nukleinsäure über deren 3'-Ende möglich, dass für die Ausbildung der direkten oder indirekten Bindung der Zuckeranteil des Zucker-Phosphat-Rückgrats, der Phosphatanteil des Zucker-Phosphat-Rückgrats und/oder der Basenanteil der die Nukleinsäure ausbildenden Nukleotide verwendet wird. Dabei kann desweiteren vorgesehen sein, dass ein jeder der vorstehend genannten Anteile in modifizierter Form vorliegt und die Modifizierung entweder zu Zwecken der Immobilisierung oder zu Zwecken der Stabilisierung der Nukleinsäure vorgenommen sein kann.

Infolge dieser überraschenden Eigenschaften eignet sich eine derartige immobilisierte Nukleinsäure hervorragend als Affinitätsligand für die Apherese und die Affinitätschromatographie, ganz besonders dann, wenn die Nukleinsäure funktional ist, d.h. spezifisch mit einer Verbindung, Molekül oder Molekül(teil)struktur in Wechselwirkung tritt. Die Wechselwirkung kann dabei reversibel oder irreversibel sein, wobei die reversible Wechselwirkung die bevorzugte ist, da sie eine Regeneration und damit Wiederverwendung der gekoppelten Nukleinsäure erlaubt.

In diesem Zusammenhang verdient insbesondere die überraschende Erkenntnis Beachtung, dass die immobilisierten Spiegelmer nicht nur – biologisch ebenso wie physikalisch – stabil sind, sondern darüber hinaus auch noch ihre Affinität und Spezifität gegenüber dem Zielmolekül erhalten bleibt. Dies ist insoweit überraschend, als dass die sogenannte Spiegelmer-Technologie erst vor kurzem entwickelt wurde, mithin ausgehend von einer Nukleinsäuresequenz, die aus natürlich vorkommenden D-Nukleotiden besteht und an ein in seiner nicht-natürlichen Form vorliegendes Zielmolekül, beispielsweise ein D-Peptid, bindet, eine Nukleinsäure mit der gleichen Sequenz, jedoch bestehend aus den nicht natürlichen L-Nukleotiden, erzeugt werden kann, die dann an das natürlich vorkommende Zielmolekül, im Falle eines Proteins als an das L-Protein, bindet.

Unter Funktionalität einer Nukleinsäure wird hierin die intrinsische Bindungseigenschaft oder Affinität dieser Nukleinsäure für ein Targetmolekül (hierin auch als "target" oder Zielmolekül bezeichnet) verstanden, die hergestellt wird durch nicht-kovalente Wechselwirkung wie z. B. durch Wasserstoffbrückenbindungen, Coulomb-Wechselwirkungen, van der Waals-Wechselwirkungen, hydrophobe Wechselwirkungen, koordinative Wechselwirkungen jeweils

einzelnen oder in Kombination zwischen der Nukleinsäure und dem Target. Im Einzelfall kann die nicht-kovalente Wechselwirkung auch in eine kovalente Wechselwirkung überführt werden.

Unter „funktionaler Nukleinsäure“ wird hierin insbesondere eine Nukleinsäure verstanden, die das Ergebnis der hierin beschriebenen Selektionsverfahren ist. Damit sind funktionale Nukleinsäuren insbesondere solche, die an ein Zielmolekül oder einen Teil davon binden und das Ergebnis des Kontaktierens einer Nukleinsäurebibliothek, insbesondere einer statistischen Nukleinsäurebibliothek, mit dem Zielmolekül sind. Funktionale Nukleinsäuren sind somit insbesondere auch Aptamere und Spiegelmer. Die hierin offenbarten immobilisierten Nukleinsäuren und insbesondere die immobilisierten Aptamere und immobilisierten Spiegelmer stellen somit physikalisch und biologisch stabile immobilisierte Nukleinsäuren dar. Infolge dieser Stabilität können sowohl die immobilisierten Aptamere wie auch die immobilisierten Spiegelmer für die Apherese verwendet werden. Funktional aktive Nukleinsäuren sind hierin insbesondere solche, die an ein Zielmolekül oder einen Teil davon binden, bevorzugterweise mit hoher Affinität und Spezifität und insbesondere das Ergebnis des Kontaktierens einer Nukleinsäurebibliothek, insbesondere einer statistischen Nukleinsäurebibliothek, mit dem Zielmolekül sind. Funktionale Nukleinsäuren sind somit insbesondere auch Aptamere und Spiegelmer.

Eine weitere Anwendung der immobilisierten Aptamere und der immobilisierten Spiegelmer stellt die Verwendung im Rahmen der Affinitätsreinigung, wie beispielsweise der Affinitätschromatographie, dar. Sowohl bei der Apherese als auch bei der Affinitätsreinigung stellen die Aptamere ebenso wie die Spiegelmer die – biologisch wie physikalisch – stabilen Liganden dar, die an die jeweils geeignete Matrix immobilisiert sind unter Beibehaltung der für sie als funktionale Nukleinsäuren typischen hohen Affinität und Spezifität gegenüber dem Zielmolekül, oder einem Teils davon, das typischerweise zu ihrer Erzeugung im Rahmen der evolutiven Selektionsprozesse verwendet wurde.

Für beide Anwendungen sind den Fachleuten auf dem Gebiet geeignete Trägermaterialien oder Matrices bekannt, die alle grundsätzlich auch für die Immobilisierung der Aptamere und der Spiegelmer verwendet werden können. Die Immobilisierungsarten und Immobilisierungsbedingungen sind den Fachleuten auf dem Gebiet bekannt und umfassen insbesondere auch jene, die hierin beschrieben sind. Dabei soll insbesondere unter Hinweis auf

die Beispiele verstanden werden, dass die dort beschriebenen Techniken grundsätzlich sowohl für Aptamere als auch Spiegelmer angewandt werden können.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird als Nukleinsäure, die an eine Matrix gebunden oder immobilisiert wird, bevorzugt ein Aptamer und/oder ein Spiegelmer verwendet.

Bei den Aptameren handelt es sich um kurze Oligonukleotide auf DNA- oder RNA-Basis, die eine Bindungseigenschaft für ein Targetmolekül aufweisen; die DNA- oder RNA-Moleküle können sowohl aus natürlich konfigurierten als auch aus nicht-natürlich konfigurierten Nukleotiden oder Mischungen davon bestehen, die zudem auch dem Stand der Technik nach an den jeweiligen Basen oder Zuckern modifiziert sein können. Gängige Modifikationen der Zucker bei Nukleinsäuremolekülen sind z. B. 2'-Amino-, 2'-O-Alkyl-, 2'-O-Allylmodifikationen (Osborne & Ellington, 1997, Chem. Rev. 97, 349-370). Eine mögliche Modifikation des Zucker-Phosphat-Rückgrats ist die Verwendung von Peptid Nucleic Acids (PNA), weitere Rückgratmodifikationen sind in R.S. Varma, 1993, SYNLETT September beschrieben.

Für ein Selektionsverfahren zur Entwicklung funktionaler Nukleinsäuren werden zunächst kombinatorische DNA-Bibliotheken hergestellt. In der Regel handelt es sich um die Synthese von DNA-Oligonukleotiden, die zentral einen Bereich aus 10-100 randomisierten Nukleotiden enthalten, die von zwei primer-Bindungsregionen 5'- und 3'-terminal flankiert werden. Die Herstellung derartiger kombinatorischer Bibliotheken ist bspw. beschrieben in Conrad, R.C., Giver, L., Tian, Y. and Ellington, A.D., 1996, Methods Enzymol., Vol 267, 336-367. Eine solche chemisch synthetisierte einzelsträngige DNA-Bibliothek lässt sich über die Polymerase-Kettenreaktion in eine doppelsträngige Bibliothek überführen, die für sich genommen schon für eine Selektion eingesetzt werden kann. In der Regel erfolgt jedoch mit geeigneten Methoden eine Separation der einzelnen Stränge, so dass man wieder zu einer Einzelstrangbibliothek gelangt, die für das in vitro Selektionsverfahren eingesetzt wird, wenn es sich um eine DNA-Selektion handelt (Bock, L.C., Griffin, L.C., Latham, J.A., Vermaas, E.H. und Toole, J.J., 1992, Nature, Vol. 355, 564-566). Es ist jedoch ebenso möglich, die chemisch synthetisierte DNA-Bibliothek direkt in die in vitro Selektion einzusetzen. Darüber hinaus kann prinzipiell aus doppelsträngiger DNA, wenn zuvor ein T7 Promotor eingeführt worden ist, auch über eine geeignete DNA-abhängige Polymerase, z. B. die T7 RNA Polymerase, eine RNA-Bibliothek erzeugt werden. Die T7 RNA Polymerase ist ebenso in der Lage, 2'-Fluoro- oder 2'-

Aminonukleotide einzubauen. Mit Hilfe der beschriebenen Verfahren ist es möglich, Bibliotheken von  $10^{15}$  und mehr DNA- oder RNA-Molekülen zu erzeugen. Jedes Molekül aus dieser Bibliothek hat eine andere Sequenz und somit eine andere dreidimensionale Struktur. Über das in vitro Selektionsverfahren ist es nun möglich, aus der erwähnten Bibliothek durch mehrere Zyklen von Selektion und Amplifikation sowie gegebenenfalls Mutation ein oder mehrere DNA-Moleküle zu isolieren, die gegen ein gegebenes Target eine signifikante Bindungseigenschaft aufweisen. Die Targets können z.B. Viren, Proteine, Peptide, Nukleinsäuren, kleine Moleküle wie Metaboliten des Stoffwechsels, pharmazeutische Wirkstoffe oder deren Metaboliten oder andere chemische, biochemische oder biologische Komponenten sein wie beispielsweise in Gold, L., Polisky, B., Uhlenbeck, O. und Yarus, 1995, Annu. Rev. Biochem. Vol. 64, 763-797 und Lorsch, J.R. und Szostak, J.W., 1996, Combinatorial Libraries, Synthesis, Screening and application potential, ed. Riccardo Cortese, Walter de Gruyter, Berlin, beschrieben. Das Verfahren wird in der Weise durchgeführt, dass bindende DNA- oder RNA-Moleküle aus der ursprünglich eingesetzten Bibliothek isoliert werden und nach dem Selektionsschritt mittels Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert werden. Bei RNA-Selektionen ist vor dem Amplifikationsschritt durch Polymerase Kettenreaktion eine reverse Transkription vorzuschalten. Eine nach einer ersten Selektionsrunde angereicherte Bibliothek kann dann in eine erneute Selektionsrunde eingesetzt werden, so dass die in der ersten Selektionsrunde angereicherten Moleküle die Chance haben, durch Selektion und Amplifikation sich erneut durchzusetzen und mit noch mehr Tochtermolekülen in eine weitere Selektionsrunde zu gehen. Gleichzeitig erlaubt der Schritt der Polymerase-Kettenreaktion die Möglichkeit, neue Mutationen bei der Amplifikation z. B. durch die Variation der Salzkonzentration einzubringen. Nach genügend vielen Selektions- und Amplifikationsrunden haben sich die bindenden Moleküle durchgesetzt. Es ist so ein angereicherter Pool entstanden, dessen Vertreter durch Klonierung vereinzelt und anschließend mit den gängigen Methoden der Sequenzbestimmung von DNA in ihrer Primärstruktur bestimmt werden können. Die erhaltenen Sequenzen werden dann auf ihre Bindungseigenschaften hinsichtlich des Targets überprüft. Das Verfahren zur Erzeugung derartiger Aptamere wird auch als SELEX-Verfahren bezeichnet und ist bspw. beschrieben in EP 0 533 838, dessen Offenbarung hierin durch Bezugnahme aufgenommen wird.

Die besten Bindungsmoleküle können durch Verkürzung der Primärsequenzen auf ihre wesentliche Bindungsdomäne hin verkürzt und durch chemische oder enzymatische Synthese dargestellt werden.

Eine besondere Form von Aptameren sind die sogenannten Spiegelmere, die sich im wesentlichen dadurch auszeichnen, dass sie zumindest teilweise, bevorzugt vollständig aus den nicht-natürlichen L-Nukleotiden aufgebaut sind. Verfahren zur Herstellung derartiger Spiegelmere sind beschrieben in PCT/EP97/04726, deren Offenbarung hiermit durch Bezugnahme aufgenommen wird. Die Besonderheit dieses Verfahrens liegt in der Erzeugung enantiomerer Nukleinsäuremoleküle, die an ein natives, d.h. in der natürlichen Form oder Konfiguration vorliegendes Target oder eine derartige Targetstruktur binden. Das oben beschriebene In vitro Selektionsverfahren wird dazu eingesetzt, bindende Sequenzen zunächst gegen die enantiomere Struktur eines natürlicherweise vorkommenden Targets zu selektieren. Die so erhaltenen Bindungsmoleküle (D-DNA, D-RNA bzw. entsprechende D-Derivate) werden in ihrer Sequenz bestimmt und die identische Sequenz wird dann mit spiegelbildlichen Nukleotidbausteinen (L-Nukleotide bzw. L-Nukleotidderivate) synthetisiert. Die so erhaltenen spiegelbildlichen, enantiomeren Nukleinsäuren (L-DNA, L-RNA bzw. entsprechende L-Derivate), sogenannte Spiegelmere, haben aus Symmetriegründen eine spiegelbildliche Tertiärstruktur und somit eine Bindungseigenschaft für das in der natürlichen Form oder Konfiguration vorliegende Target.

Neben der Verwendung von "reinen" Aptameren, d.h. solchen Aptameren, die nur aus natürlich vorkommenden D-Nukleotiden oder deren Derivaten aufgebaut sind, ist es auch möglich, dass ein oder mehrere der das Aptamer aufbauenden Nukleotide in der nicht-natürlichen Form vorliegt/vorliegen. Im gleichen Maße kann auch vorgesehen sein, dass die natürlich vorkommenden und/oder die nicht natürlich vorkommenden Nukleotide modifiziert sind. Derartige Modifikationen können bspw. am Zucker-Phosphat-Rückgrat aber auch an den Nukleobasen der Nukleinsäure vorgenommen werden. Das vorstehend für Aptamere Gesagte gilt auch für Spiegelmere.

Hinsichtlich der Länge der immobilisierten Nukleinsäure sind grundsätzlich keine Beschränkungen gegeben. Bevorzugterweise umfasst die immobilisierte Nukleinsäure jedoch mindestens 25 Nukleotide. Weitere bevorzugte Mindestlängen der immobilisierten Nukleinsäure sind Längen von mindestens etwa 15 Nukleotiden, 20 Nukleotiden, 25 Nukleotiden, 30 Nukleotiden, 35 Nukleotiden, 40 Nukleotiden, 50 Nukleotiden, 60 Nukleotiden, 90 Nukleotiden und 100 Nukleotiden.

Bei dem Verfahren zur Elution eines an einer Nukleinsäure, insbesondere einer erfindungsgemäßen immobilisierten Nukleinsäure, gebundenen Zielmoleküls ist vorgesehen, dass die Elution unter Verwendung von destilliertem Wasser bei erhöhter Temperatur erfolgt. Überraschenderweise wird mit diesem einfachen Verfahren eine Auflösung des Komplexes aus immobilisierter Nukleinsäure und Zielmolekül bedingt, ohne dass die Beteiligung von Salzen, wie diese bei normalen Elutionsverfahren oftmals verwendet werden, erforderlich wird. Infolgedessen ergeben sich insbesondere bei einer großtechnischen Anwendung der immobilisierten Nukleinsäure Vorteile dergestalt, dass die Salzfracht im Abwasser entsprechend gering ist bzw. bei Verwendung von anderen Chemikalien als Salzen zur Elution die entsprechenden Verbindungen, wie beispielsweise Harnstoff oder Guanidinium-Thiocyanat, nicht erforderlich wird. Auch bei diesen Elutionsbedingungen ist eine erneute Verwendung der immobilisierten Nukleinsäure als entsprechende Affinitätsmatrix möglich. Hinsichtlich der verwendeten Temperaturen kann diese leicht durch routinemäßige Überprüfung ausgehend von dem spezifischen Nukleinsäure-Zielmolekül-Paar ermittelt werden. Typischerweise beträgt die Temperatur mindestens 45°C. Weitere bevorzugte Temperaturbereiche betragen mindestens 50°C oder 55°C.

Die diesem Verfahren zugrundeliegende Erkenntnis ist insoweit überraschend, als dass man bisher von der Wirkung hochmolarer Salzlösungen bei der Auflösung der spezifischen Wechselwirkungen zwischen Nukleinsäure und Zielmolekül ausgegangen ist. Bei der Verwendung von deionisiertem, destilliertem oder noch weiter aufgereinigtem Wasser im Rahmen des Verfahrens zur Elution sind diese Salze bzw. Störungs- oder komplexauflösenden Mechanismen nicht praktikabel. Vielmehr scheint es so zu sein, dass sich bei Abwesenheit entsprechender stabilisierender Salze oder Verbindungen bzw. bei Verwendung von entsalztem Wasser die Struktur entweder des Zielmoleküls oder aber der immobilisierten Nukleinsäure in dem Maße ändert, dass es zu einer Auflösung des Komplexes aus immobilisierter Nukleinsäure und Zielmolekül kommt.

Eine Modifikation des Zucker-Phosphat-Rückgrats oder der Nukleobase(n) kann neben der Verbesserung der Stabilität der gekoppelten Nukleinsäure auch zur Kopplung oder Immobilisierung unter Erhalt der Funktionalität der Nukleinsäure genutzt werden. Dabei ist es auch möglich, dass zumindest eine der Basen der Nukleinsäuren funktionalisiert wird, die für die

Funktion der Nukleinsäure nicht essentiell ist/sind, so dass die Kopplung bzw. Immobilisierung unter Erhalt der Funktion erfolgt.

Die für die Herstellung der immobilisierten Nukleinsäure erforderliche chemische Synthese von DNA-Molekülen und RNA-Molekülen ist seit mehr als 20 Jahren gut etabliert und kann in guten Ausbeuten z. B. nach der Phosphoramiditmethode durchgeführt werden (Beaucage & Iyer 1992, *Tetrahedron Lett.* 22, 1859-1862). Andere Synthesestrategien wie die H-Phosphonat- oder die Phosphorsäuretriester-Methode sind in Blackburn, G.M. und Gait, M.J., 1992, *Nucleic acids in Chemistry and Biology*, IRL Press Oxford und in Marshall & Boymel (*Drug Discovery Today*, 1998, Vol. 3, No. 1) beschrieben, deren Offenbarung hiermit durch Bezugnahme aufgenommen wird. Über den Ansatz der chemischen Synthese ist es auch einfach möglich, Modifikationen sowohl zum Zwecke der Immobilisierung als auch der Stabilisierung der Nukleinsäure in RNA- und DNA-Moleküle einzubringen. Sowohl die Termini, d.h. Enden, als auch das Phosphat-Rückgrat lassen sich mit verschiedenen Reagenzien chemisch modifizieren. Modifikationen können an die Nukleinsäure sowohl während der Festphasensynthese als auch postsynthetisch angefügt werden. Ein Beispiel für ein während der chemischen Synthese eingefügtes Linkermolekül ist (1-Dimethoxytrityloxy-3-fluorenylmethoxycarbonylamino-hexan-2-methylsuccinoyl)-long chain alkylamino-CPG (3'-Amino-Modifier C7 CPG, Firma Glen Research, Virginia, USA). Durch Verwendung dieses Linkermoleküls oder dieser Linkerstruktur wird ein 7 Atome umfassender Spacer, der mit einer primären Aminogruppe endet, an das 3'-Phosphat der Nukleinsäure angefügt. Ein zweites Beispiel ist die 3'-terminale Einführung eines mit einem Biotin verknüpften Spacers durch die Verwendung von 1-Dimethoxytrityloxy-3-O-(N-biotinyl-3-aminopropyl)-triethylenglycol-glyceryl-2-O-succinoyl- long chain alkylamino CPG (Biotin TEG CPG, Firma Glen Research, Virginia, USA). Eine Übersicht über mögliche Modifikationen, die während der Synthese eingeführt werden, gibt die Produktinformation der Firma Glen Research, Virginia, USA: *User Guide to DNA Modification, Products for DNA Research*, sowie S. L. Beaucage, R. P. Iyer, *Tetrahedron* 1993, 49, 1925-1963.

Die postsynthetische Modifikation von DNA kann z. B. mittels homo- oder heterobifunktioneller Linkermoleküle erfolgen, die entweder bereits präaktiviert sind oder durch Zusatz geeigneter Kopplungsreagenzien aktiviert werden. Beispiele nicht-aktivierter homobifunktioneller Linkermoleküle sind Diamine oder Dicarbonsäuren, Beispiele für aktivierte homobifunktionelle Linker sind Glutardialdehyd oder die Anhydride von Dicarbonsäuren, ein mit Pyridyl-Disulfid



aktivierter N-Hydroxysuccinimidester wäre ein Beispiel für einen präaktivierten heterobifunktionellen Linker usw.

Es hat sich gezeigt, dass funktionale Aptamere und Spiegelmerere dergestalt entwickelt werden können, dass sie sich hervorragend als spezifische Liganden für die Entwicklung völlig neuartiger Adsorber für die extrakorporale Blutreinigung eignen. Hierzu werden nach dem oben beschriebenen in vitro Selektions oder in vitro Evolutionsverfahren Aptamere bzw. Spiegelmerere gegen als Target bezeichnete Moleküle oder Strukturen erzeugt, die beispielsweise für die Ausbildung einer oder mehrerer Krankheiten verantwortlich sein können. Es kann sich bei oben genannten Molekülen oder Strukturen z.B. um Viren, Viroide, Bakterien, Zelloberflächen, Zellorganellen, Proteine, Peptide, Nukleinsäuren, kleine Moleküle wie Metaboliten des Stoffwechsels, pharmazeutische Wirkstoffe oder deren Metaboliten oder andere chemische, biochemische oder biologische Komponenten als Targets handeln. Die Aptamere werden entsprechend ihren Eigenschaften charakterisiert. Aptamere in ihrer nativen, d.h. nicht derivatisierten, Form an sich eignen sich in der Regel nicht für den Einsatz in der therapeutischen Apherese, da sie in der Umgebung von biologischen Flüssigkeiten wie z. B. Blut durch Nukleasen abgebaut werden und so ihre Funktionalität verlieren. Es hat sich allerdings überraschenderweise gezeigt, dass die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, d.h. gekoppelte Nukleinsäuren, wobei die Nukleinsäure zumindest über ihr 3'-Ende an die Matrix gekoppelt ist, mithin durch die erfindungsgemäße Immobilisierung des Aptamers an eine für die Apherese geeignete feste Phase über das 3'-Ende insbesondere unter Verwendung einer weiteren Modifikation am 5'-Ende oder durch doppelte Immobilisierung über das 3'- und das 5'-Ende eine extrem große Stabilität in humanem Serum und Vollblut erreicht werden konnte.

Das vorstehend zu Aptameren Gesagte gilt sinngemäß auch für Spiegelmerere.

Der Begriff der Bindung einer Nukleinsäure an eine Matrix soll hierin so verstanden werden, dass die Nukleinsäure direkt oder indirekt über die verschiedenen Bindungsformen an die Matrix gebunden ist. Die verschiedenen Bindungsformen umfassen dabei unter anderem kovalente Bindung, nicht-kovalente Bindung (insbesondere Wasserstoffbrückenbindung, Coulomb-Wechselwirkung, van der Waals-Wechselwirkungen, hydrophobe Wechselwirkung und ionische Bindung) und koordinative Bindung, wie hierin noch weiter im Zusammenhang mit den verschiedenen Immobilisierungsformen definiert. Der Begriff der Bindung, wie er hierin

verwendet wird, umfasst auch den Begriff der Immobilisierung, d.h. der Bindung einer Verbindung an einen Träger. Der Träger muss dabei nicht unbedingt als Festphase vorliegen; eine Festphase als Träger ist gleichwohl bevorzugt.

Als Matrix für die Bindung oder Immobilisierung der Nukleinsäure eignen sich insbesondere auch Festphasen, die solide oder poröse Materialien sein können. Derartige Matrices sind bspw. beschrieben in P. D. G. Dean, W. S. Johnson, F. A. Middle (Ed.), *Affinity Chromatography – a practical approach*, IRL Press, Oxford, 1985. Als Beispielsmatrices seien angeführt: Agarose (ein aus roten Algen gewonnenes lineares Polymer, aufgebaut aus alternierenden D-Galactose- und 3,6-Anhydro-L-Galactose-Resten), poröse, partikuläre Tonerde (Aluminiumoxid), Cellulose (lineares Polymer von  $\beta$ -1,4-verknüpfter D-Glucose mit einigen 1,6-Bindungen), Dextran (hochmolekulares Glucose-Polymer), Eupergit™ (Firma Röhm Pharma, Oxiran-derivatisierte Acrylbeads; Copolymerisat aus Methacrylamid, Methylen-bis-Acrylamid, Glycidyl-Methacrylat und/oder Allyl-Glycidyl-Ether. Aus: Produktinformation der Firma Röhm), Glas, Controlled Pore Glass (CPG, wird durch Erhitzen von Borosilikatgläsern für längere Zeit auf 500-800°C hergestellt. Nach Phasenseparation werden die Borat-reichen Phasen unter sauren Bedingungen herausgelöst. Es resultieren Tunnel und Poren von 25-70 Angström Größe. Die Glasoberfläche wird in der Regel mit Silan-haltigen Verbindungen derivatisiert. Aus: *Affinity Chromatography – a practical approach*, IRL Press, Oxford, 1985), Hydroxyalkyl Methacrylat, Polyacrylamid, Sephadex™ (Gel auf Dextran-Basis. Aus: Produktinformation der Firma Amersham Pharmacia Biotech), Sepharose, Superose (quervernetzte Agarosen. Hersteller Amersham Pharmacia Biotech. Sepharose ist sowohl mit verschiedenen Linkern/Spacern als auch mit einer Vielzahl funktioneller Gruppen erhältlich, z.B. NHS-Ester, CNBr-aktiviert, Amino, Carboxy, aktiviertes Thiol, Epoxy usw. Aus: Pharmacia LKB Biotechnology, *Affinity Chromatography – Principles and Methods*, Schweden 1993), Sephacryl (Aus: Produktinformation der Firma Amersham Pharmacia Biotech. Sphärisches Allyl-Dextran und N,N,-Methylenbisacrylamid), Superdex (sphärisch, bestehend aus quervernetzter Agarose und Dextran. Aus: Produktinformation Firma Amersham Pharmacia Biotech), Trisacryl (wird durch Polymerisation von N-acryloyl-2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol erhalten. Aus: *Affinity Chromatography – a practical approach*, IRL Press, Oxford, 1985), Paramagnetische Partikel, Toyopearl™ (Firma TosoHaas., halbrigide, makroporöse, sphärische Matrix. Hergestellt aus einem hydrophilen Vinylcopolymer. Erhältlich mit verschiedenen Funktionalisierungen, wie z.B. Tresyl, Epoxy, Formyl, Amino, Carboxy usw. Aus: Produktinformation Firma TosoHaas), Nylon-basierende Matrices, Tentagel

(Firma Rapp Polymere, aus: [http://www.rapp-Polymere.com/preise/tent\\_sum.htm](http://www.rapp-Polymere.com/preise/tent_sum.htm). Copolymer aus niedrig vernetzter Polystyrolmatrix, die mit Polyethylenglycol oder Polyoxyethylen modifiziert ist. Die Polyethylenglycol- oder Polyoxyethyleinheiten tragen verschiedene funktionelle Gruppen), Polystyrol.

Weitere Matrices sind bspw. Kieselgel, Alumosilicate, Bentonit, poröse Keramik, verschiedene Metalloxide, Hydroxyapatit, Fibroin (Naturseide), Alginate, Carrageen, Collagen und Polyvinylalkohol.

Daneben können als Matrix auch funktionalisierte bzw. derivatisierte Membranen oder Oberflächen verwendet werden.

Die Matrices werden mittels geeigneter funktioneller Gruppen, derivatisiert, so dass man entweder Matrices erhält, die bereits präaktiviert sind, oder zu Matrices gelangt, die durch Zusatz geeigneter Agenzien aktiviert werden müssen. Beispiele für nicht-aktivierte funktionelle Gruppen, durch die Matrices derivatisiert werden können sind Amino-, Thiol-, Carboxyl-, Phosphat-, Hydroxy-Gruppen usw. Beispiele für aktivierende Derivatisierungen von Matrices sind funktionelle Gruppen wie z. B. Hydrazid, Azid, Aldehyd, Bromoacetyl, 1,1'-Carbonyldiimidazol, Cyanogenbromid, Epichlorhydrin, Epoxid (Oxiran), N-Hydroxysuccinimid und alle anderen möglichen Aktivester, Periodat, Pyridyl-Disulfid und andere gemischte Disulfide, Tosylchlorid, Tresylchlorid, Vinylsulfonyl, Benzylhalogenide, Isocyanate, photoreaktive Gruppen usw.

Besonders für die Apherese geeignet sind alle Matrices, durch die Plasma und vorzugsweise auch Vollblut geleitet werden kann, wie z. B. organische Polymere auf der Basis von z. B. Methacrylaten, natürliche Polymere auf der Basis z. B. von vernetzten Zuckerstrukturen oder auch anorganische Polymere auf der Basis z. B. von Glasstrukturen (CPG, controlled pore glass). Die mit den Liganden, d.h. Nukleinsäuren und bevorzugt funktionalen Nukleinsäuren modifizierte feste Phase, die für die Plasmapherese oder Apherese geeignet ist, wird zur Ausbildung einer Apheresevorrichtung in ein Gehäuse aus Glas, Kunststoff oder Metall gefüllt.

Die einzelnen Bestandteile einer Aphereseapparatur sind dem Fachmann bekannt. Beispiele für auf dem Markt befindliche Apheresesysteme sind das Liposorber System der Firma Kaneka

Corporation, das DALI-System (Direct Adsorption of Lipids) enthaltend das Hämoadsorptionsgerät 4008 ADS der Firma Fresenius AG, Bad Homburg, das H.E.L.P.-System (Heparin-induzierte Extrakorporale LDL-Präzipitation) der Firma B. Braun AG, Melsungen, die Systeme Ig-Therasorb, LDL-Therasorb und Rheosorb der Firma PlasmaSelect AG, Teterow, usw. (<http://www.dialysis-north.de/presents/apheresetechnikshow.htm>)

Die Bindung oder Immobilisierung der Nukleinsäure, sei es nun direkt oder indirekt, kann unter Bildung kovalenter Bindungen zwischen der Matrix bzw. bevorzugt der Festphase und der Nukleinsäure, bevorzugt der funktionalen Nukleinsäure wie Aptamer oder Spiegelmer, durch Bildung koordinativer Bindungen (Komplexe) oder durch Ausnutzung nicht-kovalenter Interaktionen, die durch Wasserstoffbrückenbindungen, Coulomb-Wechselwirkungen oder hydrophobe Wechselwirkungen vermittelt werden, erfolgen.

Unter indirekter Kopplung soll hierin verstanden werden, dass die Nukleinsäure an die Matrix bzw. das Matrixmaterial unter Vermittlung einer weiteren Struktur oder Verbindung gebunden ist bzw. wird, die als Linkerstruktur oder Spacer bezeichnet wird. Dabei kann die weitere Struktur an der Nukleinsäure, an der Matrix oder beidem vorhanden sein. Die Bindung der weiteren Struktur an die Matrix ebenso wie an die Nukleinsäure kann dabei eine jegliche der oben beschriebenen Bindungsformen oder eine Kombination davon sein.

Die Verwendung derartiger weiterer Strukturen ist in soweit vorteilhaft, als dass dadurch die Bindung zu einer besonders stabilen und spezifischen Anbindung der – funktionalen – Nukleinsäure an die Matrix bzw. Festphase führt.

Eine Linkerstruktur ist dabei eine Struktur, die gewissermaßen zwischen der Matrix und der Nukleinsäure zwischengeschaltet ist. Eine Linkerstruktur ist somit mehr funktional als chemisch definiert und dient der Bindungsvermittlung zwischen Nukleinsäure und Matrix. Dabei ist oftmals vorgesehen, dass derartige Linkerstrukturen aus zwei oder mehreren Bestandteilen aufgebaut sind und typischerweise ein Bestandteil an die Nukleinsäure und der andere Bestandteil an die Matrix gebunden ist. Beispiele für derartige Linkerstrukturen sind u.a. das Biotin-Avidin-System (M. Wilchek, E. A. Bayer, "Avidin-Biotin Technology", *Methods Enzymol* 1990, 184, S. 1-746), wobei das Avidin durch geeignete Derivate oder Analoge wie Streptavidin oder Neutravidin ersetzt sein kann. Eine weitere derartige Linkerstruktur besteht aus

Fluorescein und einen dagegen gerichteten Antikörper oder aus Digoxigenin und einen dagegen gerichteten Antikörper.

Eine weitere derartige Struktur zur Bindungsvermittlung einer Nukleinsäure an eine Matrix stellen die in der Technik, bspw. der Synthesetechnik bekannten spacer dar. Im Unterschied zu einem Linkerstruktur besteht die vorrangige Funktion eines spacers darin, zwischen zwei Strukturen oder Verbindungen einen – definierten – Abstand aufzubauen. Typischerweise erfolgt dies dadurch, dass der spacer zuerst an den einen der beiden zu verbindenden Partner gebunden wird. Es ist jedoch auch möglich, dass ein linker an beide Bindungspartner gebunden ist. Darüberhinaus erfüllt der spacer wie die Linkerstruktur auch die Funktion der Vermittlung einer Bindung zwischen den Bindungspartnern.

Es ist für den Fachmann offensichtlich, dass es Überschneidungen zwischen Linkerstrukturen und spacern gibt. So ist es durchaus möglich, dass Linkerstrukturen als spacer dienen und umgekehrt spacer als Linkerstrukturen.

Spacer liegen typischerweise in der Form X-Spacer-Y, X-Spacer-X oder Y-Spacer-X vor, wobei der Spacer einen Abstand zwischen den – funktionellen - Gruppen X und/oder Y liefert bzw. definiert, und durch die Gruppen X und Y die eigentliche Verknüpfung zwischen der Matrix und der Nukleinsäure hergestellt wird. Die Spacer finden sich als verknüpfende Atome in nach der Bindung von Nukleinsäure und Matrix wieder. Spacer können aber auch an den bereits oben geschilderten Linkerstrukturen und können z.B. eine Tetraethylenglycoleinheit umfassen (Bspl. Biotin TEG, Firma Glen Research, Virginia, USA), oder sechs Kohlenstoffatome (Bsp. Hexamethyldiamin), oder vier durch eine Säureamidbindung verknüpfte Atome (Bsp. Glycylglycin) usw. enthalten.

Bei der Auswahl der spacer werden im allgemeinen solche Verbindungen bevorzugt, die aus wenigstens vier Atomen bestehen, wobei die Atome ausgewählt sind aus der Gruppe, die C-Atome und Heteroatome umfasst. Der Begriff der Heteroatomen ist dem organisch tätigen Chemiker bekannt und umfasst unter anderem die folgenden Atome: Stickstoff, Sauerstoff, Silizium, Schwefel, Phosphor, Halogene, Bor und Vanadium.

Bevorzugterweise umfasst der spacer zumindest vier Atome, die linear oder verzweigt angeordnet sein können.

Bei der Auswahl bzw. Gestaltung eines geeigneten spacers ist es erforderlich, dass die intrinsischen Gruppen eine ausreichend große Hydrophilie vermitteln, was dadurch begründet ist, dass die gekoppelte Nukleinsäure in der Affinitätschromatographie bzw. der Apherese als typische Anwendungsgebiete mit einem hydrophilen System, insbesondere wässrigem System in Kontakt gelangen. Somit eignen sich bevorzugt auch spacer auf der Basis von Polyethylenglycoleinheiten.

Die Verwendung von Linkerstrukturen oder spacern ist bei jeder der hierin beschriebenen Bindung oder Immobilisierung einer Nukleinsäure an eine Matrix möglich. Das heißt, es ist im Rahmen der Erfindung, Linkerstrukturen oder spacer bei der Bindung der Nukleinsäure mittels des 3'-Endes der Nukleinsäure zu verwenden. Wird die Nukleinsäure zusätzlich über mindestens eine weitere Stelle der Nukleinsäure an die Matrix immobilisiert, sei es durch das 5'-Ende und/oder eine Stelle innerhalb der Nukleinsäuresequenz, kann diese Stelle im wesentlichen unabhängig davon, ob am 3'-Ende der Nukleinsäure eine Linkerstruktur oder spacer verwendet wird, ihrerseits mittels einer Linkerstruktur oder eines spacers gebunden bzw. immobilisiert sein bzw. werden.

Eine spezielle Ausgestaltung der gleichzeitigen Bindung der Nukleinsäure über ihr 3'-Ende und ihr 5'-Ende kann unter Verwendung einer Linkerstruktur oder eines spacers erfolgen, wobei beide Enden der Nukleinsäure durch die Linkerstruktur oder den spacer zusammengefasst sind und sodann an die Matrix gebunden werden. Dabei kommt es zur Ausbildung einer Y-förmigen Struktur.

Die kovalente Immobilisierung von funktionalen Nukleinsäuren erfolgt unter solchen Bedingungen, unter denen eine möglichst geringe kovalente oder nicht-kovalente Interaktion zwischen der Festphase einerseits und dem nicht-funktionalisierten Zucker-Phosphat-Rückgrats, dem nicht-funktionalisierten Zucker oder der nicht-funktionalisierten Nukleobase andererseits beobachtet wird. Die kovalente Bindung kann z.B. ein Säureamid, ein Amin, eine Schiff'sche Base, ein Phosphoramidat, ein Phosphorsäureester, ein Phosphorsäurethioester, ein Thioether, ein Thioester, ein Disulfid, ein Ether, eine C-C-Einfach- oder Mehrfachbindung, ein Oxim, ein

Carbamat, eine Stickstoff-Einfach- oder Mehrfachbindung, eine Si-C-, oder Si-O-Bindung oder jede andere kovalente Bindung der Art X-X, X-Y, Y-X, X=X, X=Y, Y=X usw. sein.

Zur kovalenten Immobilisierung kann entweder die zu koppelnde Nukleinsäure und/oder die Festphase chemisch präaktiviert werden. Die Kopplung erfolgt dann durch Inkubation von Festphase und Nukleinsäure in einem geeigneten Medium. Alternativ kann die Kopplung zwischen Festphase und Nukleinsäure unter Zusatz geeigneter Aktivierungsreagenzien (in situ) erfolgen; beispielhaft seien hier CDI (1,1'-Carbonyldiimidazol, Protokolle in: Affinity Chromatography, S.42 ff.), EDC (1-Ethyl-3-(3'-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (Protokolle in: Pharmacia LKB Biotechnology, Affinity Chromatography – Principles and Methods, Schweden 1993, S. 39 ff.) und Cyanogenbromid (L. Clerici et al., Nucl. Acids Res. 1979, 6, 247-258) aufgeführt. Auch durch Zusatz homo- und heterobifunktioneller Linkermoleküle wie Glutardialdehyd, Adipinsäuredihydrazid, Ethylenglycol-Bis[Succinimidylsuccinat] oder 4-N-(Maleimidomethyl)cyclohexancarbonsäure-N-hydroxysuccinimidester, etc. (Übersicht in: Sigma Produktkatalog, Biochemikalien und Reagenzien für die Life Science Forschung, 1999, S. 303-305) kann die kovalente Anbindung an eine Festphase erfolgen. Kovalent immobilisierte Nukleinsäuren sind auch durch Festphasensynthese direkt zugänglich, wobei der Linker zwischen Festphase und Nukleinsäure unter den Deblockierungsbedingungen der für die Synthese erforderlichen Schutzgruppen stabil sein muss. Beispiele für nach dem Stand der Technik bekannte kovalente Immobilisierungsverfahren für Nukleinsäuren sind die Carbodiimid-vermittelte Immobilisierung von DNA an Hydroxygruppen-haltige Festphasen über terminale Phosphatgruppen unter Ausbildung von Phosphorsäureestern [P. T. Gilham, 1997, Methods in Enzymology, Vol 21, Part D, 191-197], die Carbodiimid-vermittelte Immobilisierung terminal phosphorylierter Nukleinsäuren an Aminogruppen-haltige Festphasen unter Bildung von Phosphoramidaten [S. S. Gosh, G. F. Musso, 1987, Nucl. Acids Res., 15, 5353-5372], die Immobilisierung aminoalkylmodifizierter Nukleinsäuren an als N-Hydroxysuccinimid aktivierte Carboxylgruppen unter Bildung von Säureamiden [S. S. Gosh, G. F. Musso, 1987, Nucl. Acids Res., 15, 5353-5372], die durch 1,1'-Carbonyldiimidazol (CDI) vermittelte Bindung aminoalkylmodifizierter Nukleinsäuren an Hydroxygruppen-haltige Oberflächen unter Ausbildung von Carbamaten [R. Potyrailo *et al.*, Anal. Chem., 1998, 70, 3419-3425], die reduktive Kopplung aminoalkylmodifizierter Oligonukleotide an Aldehydgruppen der Festphase [E. Timofeev et al., 1996, Nucl. Acids Res., 24, 3142-3148] usw.

Die nicht-kovalente Immobilisierung von Nukleinsäuren kann unter Ausnutzung affiner Ligand-Ligand-Interaktionen erfolgen, wobei die Nukleinsäure mit einem Teil des interagierenden Paares verknüpft wird, während der andere Affinitätsligand an der Oberfläche der Festphase immobilisiert ist. Beispiele für Paare von Affinitätsliganden sind Biotin-Avidin (-Streptavidin, -Neutravidin), Antikörper-Antigen, Nukleinsäure-bindendes Protein-Nukleinsäure, Hybridisierungen zwischen komplementären Nukleinsäuren usw. Unter Ausnutzung nicht-kovalenter Wechselwirkungen kann z. B. eine biotinylierte Nukleinsäure an eine Streptavidinmatrix spezifisch gebunden werden [T. S. Romig et al., 1999, Journal Chromatogr. B, 731, 275-284]. Eine mit einem Poly-A-tail (z. B. messenger RNA) versehene Nukleinsäure kann spezifisch an eine Poly-dT-Matrix gebunden werden [J. Gielen, 1974, Arch. Biochem. Biophys., 163, 146-154]. Eine mit Fluorescein derivatisierte Nukleinsäure kann an eine mit Anti-Fluorescein-Antikörpern belegte Oberfläche gebunden werden (oder umgekehrt).

Auch koordinative Bindungen (z.B. Metallkomplexe) können zur Immobilisierung von Nukleinsäuren an Festphasen verwendet werden. In solchen Systemen ist entweder die Nukleinsäure mit einem Metallion funktionalisiert und der Komplexligand befindet sich auf der Oberfläche der Festphase, oder die Nukleinsäure ist mit einem Komplexliganden funktionalisiert und das Metallion befindet sich auf der Festphase. Ein Beispiel für die Immobilisierung einer Nukleinsäure unter Ausnutzung koordinativer Bindungen ist die Funktionalisierung einer Nukleinsäure mit 6 aufeinander folgenden 6-Histaminylpurin-Einheiten (H6-tag) und deren Immobilisierung an einer  $\text{Ni}^{2+}$ -Matrix [M. Changee, 1996, Nucl. Acids Res., 24, 3806-3810].

Obwohl die Stabilität der über ihr 3'-Ende gekoppelten Nukleinsäure und insbesondere die Stabilität gegen Nukleasen, d. h. sowohl Endonukleasen als auch 3'- und 5'-Exonukleasen, bereits sehr hoch ist, kann diese noch durch eine 5'-terminale Modifikation der Nukleinsäure gesteigert werden. Als 5'-terminale Modifikation eignen sich zum Beispiel nicht-natürlich konfigurierte Nukleoside wie L-C, L-G, L-T, L-A oder ein inverses T oder eine beliebig lange Kohlenstoffkette oder eine PEG-Modifikation oder jede andere chemische Modifikation, die kein Substrat für ein natürlicherweise vorkommendes Enzym darstellt.

Wie bereits oben ausgeführt, hat sich weiterhin überraschenderweise gezeigt, dass Nukleinsäuren und insbesondere funktionale Nukleinsäuren (Aptamere und Spiegelmer) z. T. mehrfach dampfsterilisierbar bei 120 °C für mindestens 30 Minuten sind, wenn sie über die



erfindungsgemäßen Immobilisierungsstrategien an eine Matrix und vor allem an eine feste Phase immobilisiert wurden. Diese unerwartete Eigenschaft von spezifisch immobilisierten Aptameren oder Spiegelmeren eröffnet völlig neue Perspektiven für den Produktionsprozess von Adsorbern auf der Basis funktionaler Nukleinsäuren, wie Aptameradsorbern oder Spiegelmeradsorbern. So ist das Trägermaterial in herkömmlichen Reaktionsschritten mit der jeweiligen Nukleinsäure als Ligand zu modifizieren, das modifizierte Trägermaterial in eine entsprechende Vorrichtung zu füllen, und der gesamte Adsorber kann dann dampfsterilisiert und anschließend steril verpackt werden und ist für den therapeutischen Einsatz in der extrakorporalen Blutreinigung geeignet.

Das hierin offenbarte Verfahren zur Elution von Zielmolekülen von immobilisierten funktionalen Nukleinsäuren weist gegenüber den Verfahren im Stand der Technik eine Reihe von Vorteilen auf. So ist insbesondere die Verwendung von großen Salzmengen, wie beispielsweise 8 M Harnstoff, die insbesondere in der großtechnischen Anwendung mit einer nicht unerheblichen Salzfracht einhergeht, praktisch nicht vorhanden. Ebenfalls nicht vorhanden sind die in ihrer Entsorgung zum Teil problematischen anderen Verbindungen, die bei Elutionsverfahren nach dem Stand der Technik eingesetzt werden, wie beispielsweise Guanidiniumthiocyanat. Das hierin offenbarte Verfahren zur Elution kann dabei sowohl im Rahmen der Verwendung der immobilisierten Nukleinsäuren für die Apherese, als auch für die Anwendung als Affinitätsmedium, beispielsweise im Rahmen der Affinitätsreinigung wie Affinitätschromatographie eingesetzt werden. Die Verwendung von immobilisierten funktionalen Nukleinsäuren im Rahmen einer Affinitätsreinigung kann beispielsweise erfolgen bei der Aufreinigung von rekombinant hergestellten Proteinen. Eine weitere Anwendung der erfindungsgemäßen immobilisierten Nukleinsäuren findet sich im Bereich der Diagnostik, wo insbesondere von dem Aspekt der Verwendung der offenbarten immobilisierten Nukleinsäuren als Affinitätsmedium Gebrauch gemacht wird.

Die Verwendung von entsalztem Wasser, wie beispielsweise destilliertem Wasser, insbesondere destilliertem Wasser, zu Elutionszwecken, ist insoweit überraschend, als dass bei herkömmlichen Elutionszwecken der Ausgestaltung spezifischer Puffer mit distinkten Salzkonzentrationen besondere Beachtung geschenkt wird. Im vorliegenden Falle scheint es so zu sein, dass durch das Fehlen entsprechender Salze in dem System aus Zielmolekül und Nukleinsäure die Faltung der Nukleinsäure so geändert wird, dass die hohe Bindungskonstante zum Zielmolekül nicht länger gegeben ist. Dabei ist besonders beachtlich, dass eine Renaturierung der Nukleinsäure jederzeit

möglich ist, so dass auch die Anwendung dieses spezifischen Elutionsverfahrens einer Regeneration der Spiegelmer aufweisenden Matrix nicht entgegensteht.

Hinsichtlich der erhöhten Temperaturen, bei denen dieses Elutionsverfahren angewandt wird, sind Temperaturen von mindestens 45°C bevorzugt. Höhere Temperaturen wie mindestens 50°C oder mindestens 55°C sind desweiteren bevorzugt. Generell hängt die Auswahl der Temperatur, bei der die Elution unter Verwendung von entsalztem Wasser durchgeführt wird, wesentlich von dem konkret vorliegenden Komplex aus – immobilisierter – Nukleinsäure und Zielmolekül ab.

Alternativ kann eine Elution des an die immobilisierte Nukleinsäure gebundenen Zielmoleküls auch unter Verwendung der im Stand der Technik bekannten Elutionsverfahren erfolgen. Dazu gehört unter anderem auch die sogenannte denaturierende Elution. Die denaturierende Elution verwendet typischerweise eine der folgenden Verbindungen, bevorzugt unter hochmolaren Bedingungen: Guanidiniumthiocyanat, Harnstoff, Guanidiniumhydrochlorid, EDTA (Ethylendiamintetraacetat) Natriumhydroxid und Kaliumhydroxid. Typische Molaritäten sind im Falle der Verwendung von Guanidiniumthiocyanat oder Guanidiniumhydrochlorid 4 M, im Falle der Verwendung von Harnstoff 8 M. Bei der denaturierenden Elution können darüber hinaus auch basische Verbindungen wie NaOH oder KOH verwendet werden. Weiterhin können allgemein hohe Salzkonzentrationen unter Beteiligung von Na-Ionen oder Kalium-Ionen verwendet werden.

Die Erfindung wird im weiteren anhand der Figuren, Beispiele und des Sequenzprotokolls veranschaulicht werden, aus denen sich weitere Merkmale, Ausführungsformen und Vorteile der Erfindung ergeben. Dabei zeigt

Fig. 1 den Prozess der kovalenten Modifikation einer Festphase, durch den eine Oxirangruppen enthaltende Matrix zunächst in eine primäre Aminogruppen enthaltende Matrix überführt wird. Mittels eines präaktivierten, bifunktionellen Linkers erfolgt dann die Einführung einer Carbonsäurefunktion an die Matrix;

Fig. 2 die Bindung einer 3'-aminoalkylmodifizierten, 5'-terminal radioaktiv markierten Nukleinsäure unter Zusatz eines Kopplungsreagenzes an die Festphase;

Fig. 3 eine Übersicht der verschiedenen Derivate der zu immobilisierenden Nukleinsäuren, wie in den Beispielen beschrieben;

Fig. 4 das Adsorptionsprofil eines GnRH-Adsorbers auf der Grundlage einer Sepharose-Matrix;

Fig. 5 eine Darstellung der Adsorptionskapazität verschiedener Adsorber aus verschiedenem Matrixmaterial;

Fig. 6 eine Darstellung der Adsorberkapazität;

Fig. 7 das Adsorptionsprofil eines GnRH-Adsorbers auf der Grundlage einer Sepharose FF-Matrix; und

Fig. 8 die chemischen Strukturformeln von Spacer 9, Biotinphosphoramidit und chemical phosphorylation reagent II.

Beispiele:

**Beispiel 1: Immobilisierung radioaktiv markierter aminomodifizierter DNA an Eupergit C mit anschließender Stabilitätsuntersuchung**

Das Anwendungsbeispiel zeigt die kovalente Modifikation der Festphase, die anschließende Kopplung oder Bindung aminomodifizierter DNA, wie sie in Fig. 2 dargestellt ist und die Stabilitätsuntersuchung der gebundenen Oligonukleotide.

Man behandelte 100 mg Eupergit C 250L (Röhm Pharma GmbH, Weiterstadt. Copolymerisat aus Methacrylamid, N-Methylen-bis-methacrylamid und oxirangruppenhaltigen Monomeren. Makroporöse Perlen mit 250 µm Durchmesser. Biokompatibel: Zeigt bei der Ratte keinerlei toxische Reaktionen bei oraler Applikation: die orale LD50 beträgt >15g/kg. Quelle: Produktinformation Röhm Pharma) über Nacht bei Raumtemperatur mit 3ml einer 16%igen

Ammoniaklösung. Anschließend wurde die Festphase 5x mit je 3ml destilliertem Wasser und 5x mit je 3ml frisch destilliertem Pyridin gewaschen. Man behandelte über Nacht mit 3ml einer gesättigten Lösung von Bernsteinsäureanhydrid in Pyridin. Nach Abschluss der Reaktion wurde die Festphase 5x mit je 3ml destilliertem Wasser und 5x mit je 3ml 0.1M HEPES-Puffer (pH 7.5) gewaschen.

20 mg der Carboxyl-modifizierten Festphase wurden mit einer frisch bereiteten Lösung von 100 µl 0.1M HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure) mit 0.2M EDC (1-Ethyl-3-(3'-dimethylaminopropyl)-carbodiimid) versetzt und gut durchmischt. Die Suspension versetzte man mit 1nmol 3'-aminomodifizierten und 5'-phosphorylierten ( $^{32}\text{P}$ ) DNA-Oligonukleotid, das am Automaten dem Stand der Technik nach mit der Phosphoramiditchemie hergestellt wurde (Blackburn, G.M. und Gait, M.J., 1992, Nucleic acids in Chemistry and Biology, IRL Press Oxford). Das 5'-Ende des DNA-Oligonukleotids wurde mit Hilfe des Enzyms T4 Polynukleotidkinase und [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]-Adenosintriphosphat nach Inkubation für eine Stunde bei 37 °C in 50 mM Tris/HCl, pH 7,6, 10 mM Magnesiumchlorid, 5 mM 1,4 Dithiothreitol, 100 µM Spermidin und 100 µM EDTA mit einem radioaktiven Phosphat markiert. Das markierte und anschließend gereinigte DNA-Molekül wurde dann für 3h bei Raumtemperatur unter sorgfältiger Durchmischung der oben aufgeführten Reaktanten inkubiert. Nach Abschluss der Reaktion wusch man die Festphase 10x mit je 1ml destilliertem Wasser und entfernte das Lösungsmittel. Durch Cerenkov-Zählung wurde die Ausbeute der Immobilisierung ermittelt. Um das Ausmaß der nicht-kovalenten Bindung an die Affinitätsmatrix zu ermitteln, wurden Parallelversuche unter den oben beschriebenen Bedingungen in Abwesenheit von EDC durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Ergebnisse der Immobilisierung 3'-aminoalkylmodifizierter, 5'-terminal radioaktiv markierter Nukleinsäuren an die Carboxyl-modifizierte Festphase und des Kontrollversuches (-EDC). Weiterhin sind die Ergebnisse der Dampfsterilisation kovalent gebundener Nukleinsäuren gezeigt.

	DNA + EDC [%]	DNA - EDC [%]	RNA + EDC [%]	RNA - EDC [%]
Immobilisierung	95±3	15±13	94±2	23±4
Sterilisation	88±3	6±3	85±5	10±5

In Tabelle 1 ist gezeigt, mit welcher Ausbeute, bezogen auf die eingesetzte Menge an Nukleinsäure die kovalente Immobilisierung von DNA und RNA an modifiziertem Eupergit C 250L verlief. Die Menge der in Abwesenheit des Kopplungsreagenzes EDC immobilisierten Nukleinsäure (-EDC) zeigt das Ausmaß der nicht-kovalenten, unspezifischen Kopplung an die Matrix. Die zweite Zeile zeigt das Ergebnis nach einer einmaligen Dampfsterilisation. Im Falle der kovalent immobilisierten DNA verbleiben nach der Dampfsterilisation etwa 88% auf der Matrix, während 6% der nicht-kovalent gebundenen DNA auf der Matrix verbleiben. Dieses Ergebnis demonstriert den stabilisierenden Effekt der Immobilisierung. Analog sind die Ergebnisse der Immobilisierung und Dampfsterilisation von 3'-aminoalkylmodifizierter RNA dargestellt.

Da die radioaktive Markierung der Nukleinsäuren 5'-terminal erfolgte und der Prozess der Matrixablösung über Cerenkov-Zählung ermittelt wurde, handelt es sich bei den detektierten Molekülen um intakte Nukleinsäuren ohne durch Strangbrüche erfolgte Degradationen.

Die Dampfsterilisation der Affinitätsmatrix erfolgte im Laborautoklaven. Die Sterilisation erfolgte für 20 min bei 121°C und 2.4 bar. Die Matrix verblieb jeweils für eine Gesamtzeit von

2h im Autoklaven. Die Menge der beim Autoklavieren abgespaltenen Oligonukleotide wurde durch Cerenkov-Zählung ermittelt (Ergebnisse siehe Tabelle 1).

Die Stabilitätsuntersuchung der Oligonukleotide erfolgte durch Inkubation der Festphase in humanem Serum bei 37 C. Der pH-Wert des Serum wurde durch den Zusatz von 10 mM Natriumphosphat, pH 7.0, zusätzlich gepuffert. Ähnliche Stabilitätsuntersuchungen wurden unter Verwendung von Plasma anstelle von Serum durchgeführt. Die Ergebnisse der entsprechenden Untersuchungen sind in den Tabellen 2 und 3 dargestellt, wobei die angegebenen Werte den Verlust an Oligonukleotid, ausgedrückt in % der ursprünglich immobilisierten Menge angeben. Die Länge der immobilisierten Nukleinsäure betrug 52 („52mer“). Die Immobilisierung erfolgte über einen am 3'-Ende an der Nukleinsäure vorhandenen Biotin-Rest ((52mer) 3'-Biotin), wobei die Nukleinsäure für einen weiteren Versuchsansatz noch am 5'-Ende ein L-Nukleotid aufwies (5'-L (52mer) 3'-Biotin).

Tabelle 2: Stabilität der immobilisierten Nukleinsäure bei Exposition gegenüber Plasma

Oligonukleotid	Verlust an immobilisierter Nukleinsäure (in %) nach Inkubation in Plasma für			Halbwertszeit in h
	3 h	5 h*	24 h	
(52mer) 3'-Biotin	9	12	40	27
5'-L (52mer) 3'-Biotin	7	9	34	35

\* : berechneter Wert aus der entsprechenden Halbwertszeit

Tabelle 3: Stabilität der immobilisierten Nukleinsäure bei Exposition gegenüber Serum

Oligonukleotid	Verlust an immobilisierter Nukleinsäure (in %) nach Inkubation in Serum für			Halbwertszeit in h
	1,5 h	5 h*	23 h	
(52mer) 3'-Biotin	5	8	33	40
5'-L (52mer) 3'- Biotin	2	6	25	59

\* : berechneter Wert aus der entsprechenden Halbwertszeit

Wie auch aus den Tabellen ersichtlich, war auch nach mehreren Stunden der Anteil der Radioaktivität an der Festphase größer als 80% . Nicht immobilisierte Oligonukleotide sind zu mehr als 50 % abgebaut.

**Beispiel 2: Immobilisierung radioaktiv markierter aminomodifizierter RNA an Eupergit C und Dampfsterilisation**

Der Versuch wurde wie oben in Beispiel 1 beschrieben unter Verwendung eines 3'-aminomodifizierten und 5'-phosphorylierten ( $^{32}\text{P}$ ) RNA-Oligonukleotid durchgeführt. RNA-Oligonukleotide wurden nach dem Stand der Technik üblichen Phosphoramiditverfahren synthetisiert und anschließend gereinigt (Ogilvie, K.K, Usman, N., Nicoghossian, K. und Cedergren, R.J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 85, 5764-5768). Die 5'-Markierung mit  $^{32}\text{P}$  wurde analog der oben beschriebenen DNA-Markierung durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 oben zusammengefasst.

**Beispiel 3: Synthese von  $^3\text{H}$ -GnRH und Oligonukleotiden**

L-GnRH (Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 1)) wurde mit einer Reinheit von > 90% von Jerini Bio Tools, Berlin, Deutschland, käuflich erworben. Die radioaktive Markierung wurde durchgeführt von Amersham Pharmacia Biotech durch

Halogenieren des Tyrosin-Rests, gefolgt von reduktiver Dehalogenierung mit Tritiumgas. Entsprechend den Herstellerangaben betrug die radiochemische Reinheit der  $^3\text{H}$ -GnRH-Präparation 45 %. Das mit Tritium versehene Peptid wurde nicht weiter gereinigt. Die Angabe hinsichtlich der radiochemischen Reinheit von 45 % besagt, dass 45 % der Radioaktivität an dem GnRH lokalisiert ist. Die verbliebenen 55 % Radioaktivität sind an anderen Komponenten des GnRH-Präparates gebunden.

Das GnRH-bindende DNA-Spiegelmer 1 (vgl. Fig. 3) mit der Sequenz

5'-GCG GCG GAG GGT GGG CTG GGG CTG GGC CGG GGG GCG TGC GTA AGC ACG  
TAG CCT CGC CGC-3' (SEQ ID No 2)

wurde auf einem Äkta Pilot 10 Synthesiser, Amersham Pharmacia Biotech, hergestellt unter Verwendung von Standardphosphoramidit-Chemie im 20  $\mu\text{mol}$ -Maßstab. Die L-DNA-Phosphoramidite wurden von ChemGenes käuflich erworben. Die verschiedenen 5'-Modifikationen, nämlich Biotin-, Amino- und Phosphatgruppe, wie dargestellt in Fig. 3, wurden zu dem Oligonukleotid 1 hinzugefügt durch Fortsetzen der vorstehend erwähnten Synthese im 1  $\mu\text{mol}$ -Maßstab auf einem ABI 394 DNA-Synthesiser, Applied Biosystem, mit den entsprechenden Phosphoramiditen.

5'-Biotinyliertes DNA-Spiegelmer 2 wurde hergestellt durch Umsetzen mit 5'-Biotin-Phosphoramidit ([1-N-( Dimethoxytrityl-biotinyl-6-aminoethyl)-(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)-phosphoramidit), Glen Research, gefolgt von Deprotektionieren und Reinigen durch PAGE (10 % PAA/8M Harnstoff). 5'-Aminohexyl-modifiziertes DNA-Spiegelmer 3 wurde durch Behandeln von 1 mit 5'-Amino-Modifier C6-Phosphoramidit (N-Monomethoxytrityl-aminohexyl-[(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)]-phosphoramidit), Research, erhalten und 5'-phosphoryliertes DNA-Spiegelmer 4 wurde hergestellt, indem zuerst Spiegelmer 1 mit Spacer 9 Phosphoramidit (9-O-Dimethoxytrityl-triethyleneglycol, 1-[ (2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)]-phosphoramidit), Glen Research, umgesetzt wurde, gefolgt von Koppeln mit chemischem Phosphorylisierungsreagenz II ([3-( Dimethoxytrityloxy) 2,2 dicarboxyethyl ]-propyl-(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)-phosphoramidit), Glen Research. Die DNA-Spiegelmere 3 und 4 wurden MMT-/DMT-ON gereinigt durch präparative RP-HPLC auf SOURCE 15 RPC,



Amersham Pharmacia Biotech. Schließlich wurden die Spiegelmer 2 bis 4 auf NAP-10-Säule, Amersham Pharmacia Biotech, entsalzt.

#### **Beispiel 4:    Herstellen der Affinitätssäulen**

Das biotinylierte Spiegelmer 2 (9,4 nmol) wurde auf Neutravidin-Agarose (Pierce, 500 µl Gel, Immobilized NeutrAvidin, Pierce; Kapazität 20 Einheiten Biotin-PNP-Ester/ml Gel) in Puffer A (100 µl, 20 mM Tris HCl pH 7,4, 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,005 % Triton X-100) bei Raumtemperatur immobilisiert. Hierin wird unter Raumtemperatur im übrigen ein Temperaturbereich von etwa 22 bis etwa 25°C verstanden. Nach 45 Minuten war die Immobilisierungsbeute, abgeschätzt auf der Grundlage der UV-Absorbanz (260 nm) des aufgetragenen und ungebundenen Spiegelmers, nahezu quantitativ.

Für die Immobilisierung von Spiegelmer 3 auf Sepharose wurde die NHS-aktivierte Sepharose 4 Fast Flow (Amersham Pharmacia Biotech, 1 ml, 16-23 µmol NHS/ml entwässertes Medium) zuerst mit 15 Säulenvolumina (SV) 1 mM Salzsäure gewaschen. Nach Inkubation mit Spiegelmer 3 (20 nmol) in 0,3 M NaHCO<sub>3</sub>-Puffer (pH 8,5, 200 µl) bei Raumtemperatur für 1 h wurde die Matrix mit 10 mM NaOH/2M NaCl-Lösung (5 SV), 0,3 M NaOAc-Puffer (pH 5,5, 5 SV) und Puffer A (5 SV) gewaschen. Die geschätzte Ausbeute betrug 80 – 90 %.

Spiegelmer 4 wurde auf CPG immobilisiert. Vor der Immobilisierung von Spiegelmer 4 auf CPG wurde die 3000A Icaa CPG (long chain aminoalkyl Controlled Pore Glass, CPG Biotech; 1 g, Kapazität 32,6 µmol/g) mit 0,1 % Heringsperma-DNA (Roche) in Puffer B (10 ml, 10 mM Tris-HCl/1 mM EDTA, pH 7,4) bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert. Nach Waschen von 0,6 ml Matrix mit Puffer B (5 ml) und 0,2 M N-Methylimidazol-Hydrochlorid (2 ml, pH 6) wurde das CPG über Nacht bei Raumtemperatur mit einer Lösung von DNA-Spiegelmer 4 (18,3 nmol) in 0,1 M N-Methylimidazol-Hydrochlorid/0,1 M EDC (0,5 ml, pH 6) geschüttelt. Die geschätzte Kopplungsausbeute betrug 40 - 50 %.

Die solchermaßen hergestellten Affinitätsmedien sind sowohl solche, bei denen ein GnRH-bindendes DNA-Spiegelmer kovalent gebunden ist, als auch solche, bei denen die Bindung des Spiegelmers nicht-kovalent erfolgt. Konkret wurde das besagte Spiegelmer über eine 5'-

Modifikation an Neutravidin-Agarose, NHS-Sepharose 4 Fast Flow und 3000A lcaa-CPG immobilisiert. Die nicht-kovalente Immobilisierung des 5'-biotinylierten Spiegelmers 2 auf die Neutravidin-Agarose erfolgte in fast quantitativer Weise. Die kovalente Bindung des DNA-Spiegelmers an die Carboxyl-Sepharose und lcaa-CPG betrug 80 – 90 % bzw. 40 - 50 % über eine Amid-bzw. Phosphoramidat-Bindung.

#### **Beispiel 5: Affinitätschromatographie**

Um die Adsorptionseigenschaften der mit Spiegelmeren derivatisierten Matrices zu charakterisieren, wurden 100 µl der entsprechenden Matrix in eine 800 µl Mobicol-Säule (MoBiTec) eingefüllt. Der Säulenauslass wurde mit einem Stopfen verschlossen und eine Lösung aus GnRH (500.000 cpm, ca. 4 pmol) in Puffer A (100 µl) wurde zu der Säule hinzugegeben. Die Mischung wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Als Kontrolle wurden die entsprechenden nicht-derivatisierten Matrices (100 µl) unter den gleichen Bedingungen unter Verwendung der selben Menge an Peptid inkubiert. Nach Inkubation wurde der Durchfluss gesammelt und die Säulen mit Puffer A (7 x 100 µl) gewaschen. Die Menge an <sup>3</sup>H-markiertem GnRH in dem Durchfluss und die Waschfraktionen aller Fraktionen wurden quantifiziert unter Verwendung eines LS 5000 Szintillationszählers (Beckman). Die Menge an Radioaktivität war nach 7-maligem Waschen nahe am Hintergrundwert. Das gebundene Peptid wurde von der festen Phase bei Inkubation mit 200 µl 4 M Guanidiniumthiocyanat für 15 Minuten bei 55°C eluiert. Der Elutionsprozess wurde einmal mit 200 µl 8 M Harnstoff für 15 Minuten bei 55°C wiederholt und zweimaligem Waschen mit 100 µl 8 M Harnstoff.

Die nachfolgende Tabelle 1 zeigt die Adsorptionseigenschaften verschiedener (Spiegelmer-) Matrices, ausgedrückt als % Radioaktivität. Die Bezeichnung (x) gibt an, dass es sich bei der Matrix um eine solche handelt, die als Liganden das D-Enantiomer des Spiegelmers, mithin das Aptamer, trägt. Alle Angaben gehen dabei von einer radiochemischen Reinheit von 45 % aus

Tabelle 1

Matrix	Spiegelmer-Sephrose	Sephrose (x)	Spiegelmer-Agarose	Unmodifizier-te Agarose	Spiegelmer-CPG 3000	Unmodifizier-tes CPG 3000
Zurück-gehalten	40	4,2	36,5	1,0	23	2
Eluiert	34	0,8	34,5	0,8	20,7	0,8
Hintergrund-bindung	6	3,4	2	0,2	2,3	1,2

An der derivatisierten Neutravidin-Matrix wurden 36,5 % der Radioaktivität zurückgehalten bei einer Hintergrundbindung an Radioaktivität von 2 %, die an die nicht derivatisierte Matrix binden. Geht man von der radiochemischen Reinheit von 45 % aus, bedeutet dies, dass im vorliegenden Falle ca. 81 % der an GnRH lokalisierten Radioaktivität gebunden wurde. Nach Denaturieren des GnRH-bindenden Spiegelmers wurden 95 % der zurückgehaltenen Radioaktivität von der Matrix eluiert. Die derivatisierte Carboxyl-Sephrose zeigte ähnliche Eigenschaften, wobei dort eine Hintergrundbindung von 6 % zu beobachten war bei einer zurückbehaltenen Radioaktivität von 40 % entsprechend 89 % des GnRH. Von diesen wiederum konnten 85 % nach dem Denaturieren wiedergewonnen werden. Das Ergebnis ist nochmals in Fig. 4 dargestellt, wobei Fraktion 1 den Durchfluss darstellt, die Fraktionen 2 bis 8 Waschfraktionen darstellen, die Fraktionen 10 bis 13 diejenigen unter Denaturierung eluierten Fraktionen sind und Fraktion 14 die Fraktion mit der festen Phase ist. Im Gegensatz dazu wurde weniger Radioaktivität, nämlich 23 %, von der CPG-Matrix zurückgehalten, die eine Hintergrundbindung von 2 % aufwies.

Ein Vergleich der Adsorptionseigenschaften verschiedener des Spiegelmer gemäß SEQ ID NO:1 als Liganden aufweisender Matrixmaterialien ist in Fig. 5 nochmals dargestellt.

Um zwischen unspezifischer Bindung an dem nicht derivatisierten Träger und unspezifischer Bindung an das Oligonukleotid zu unterscheiden, wurde das D-Enantiomer des Spiegelmers, das keine Wechselwirkung mit GnRH zeigt, auf NHS-Sephrose 4 Fast Flow in analoger Weise wie die Spiegelmer immobilisiert. Nach Inkubation wurden lediglich 4,2 % der Radioaktivität auf

der Matrix zurückgehalten, und es konnten 0,8 % nach Denaturieren des Oligonukleotids eluiert werden.

**Beispiel 6: Bestimmen der Matrixkapazität**

Die Sepharose-Matrix mit einer Beladung von 1,7 nmol Spiegelmer / 100 µl Phase (Matrix) wurde mit verschiedenen Mengen an GnRH inkubiert, das mit 0,1 µl des Rohpräparats von  $^3\text{H}$ -GnRH (45 % Reinheit) versetzt war. Die Matrix wurde gewaschen und das gebundene Material wie in Beispiel 5 beschrieben eluiert.

Die Kapazität der Sepharose-Matrix wurde durch Inkubation mit einem Überschuss an GnRH bestimmt, das mit dem Rohpräparat von  $^3\text{H}$ -GnRH versetzt war. Die Auftragung von 3 nmol GnRH auf die Matrix zeigte, dass 12,4 % der Radioaktivität, mithin 28 % bei Berücksichtigung der radiochemischen Reinheit von 45 % des GnRH-Präparates, gebunden wurde. Bei einer Beladung von 1,7 nmol Spiegelmer wurden 840 pmol GnRH adsorbiert. Die Inkubation mit weniger GnRH (4,40 und 400 pmol) zeigte deutlich eine fast quantitative Adsorption des Peptids, wie dies auch in Fig. 6 dargestellt ist und auch aus der nachfolgenden Tabelle 2 ersichtlich ist. Dies stellt den überraschenden Beweis dafür dar, dass das Oligonukleotidmolekül seine bindenden Eigenschaften bei bzw. nach der Immobilisierung beibehalten hat.

Tab. 2: Adsorberkapazität von GnRH-Spiegelmer-Sepharose

pmol GnRH	% eluiert
4	34
40	33,4
400	32
3000	12,4

**Beispiel 7: Charakterisierung der gebundenen Fraktion**

Die Neutravidin-Matrix wurde inkubiert mit dem rohen  $^3\text{H}$ -GnRH-Präparat und, wie in den vorhergehenden Beispielen beschrieben, mit Wasser gewaschen. Das gebundene Material wurde durch zweimaliges Inkubieren mit bidestilliertem Wasser (0,2 ml) bei 55°C für 15 Minuten eluiert. Die kombinierten Eluate wurden lyophilisiert und durch ihre Bindung an einem GnRH-spezifischen Antikörper charakterisiert. Damit wurde unter Verwendung eines etablierten Systems in Form eines GnRH-spezifischen Antikörpers (erhalten von Biotrend, Köln, Deutschland) das Ergebnis einer Bindung unter Verwendung des immobilisierten Spiegelmers erfolgreich validiert.

**Beispiel 8: Gleichgewichtsdialyse**

Es wurde eine Gleichgewichtsdialyse von 40 µl von 10 µM Lösungen des GnRH-bindenden Spiegelmers in Puffer A gegen 40 µl Lösungen von etwa 20.000 cpm-aufweisendem gereinigtem GnRH in Puffer A bzw. ungereinigtem GnRH in Puffer A in Mikrodialysekammern durchgeführt. Die zwei Kompartimente waren durch eine Spectra/Por (Spektrum)-Zelluloseester-Dialysemembran (molekulare Ausschlussgröße 8 – 10.000 Dalton) getrennt. Nach Inkubation für 24 h bei Raumtemperatur wurden von einem jeden Kompartiment Aliquots von 35 µl abgezogen und die Radioaktivität durch Cerenkov-Szintillationszählen bestimmt. Der Unterschied der Radioaktivität in beiden Kompartimenten relativ zu der in dem Spiegelmer-enthaltenden Kompartiment enthaltenen Radioaktivität wurde als der Prozentsatz von an das Spiegelmer oder den Antikörper gebundenem GnRH gewertet.

Es wurde festgestellt, dass nach zwei Reinigungsschritten  $87 \pm 2$  % des gereinigten GnRH an das Spiegelmer bei DNA-Sättigungskonzentrationen gebunden hatten, verglichen mit 41 % der nicht gereinigten GnRH-Fraktion unter denselben Bedingungen, d. h. unter Verwendung des Spiegelmers. Gleiche Ergebnisse konnten mit dem in Beispiel 7 beschriebenen Antikörper erzielt werden.

**Beispiel 9: Verwendung des GnRH-bindenden Spiegelmers als Sensor**

Es war beabsichtigt, das GnRH bindende Spiegelmer als Sensor für die Reinheit des von der Spiegelmersäule eluierten GnRHs zu verwenden. Um das Verfahren der Gleichgewichtsdialyse zur GnRH-Reinheit zu verwenden, mussten mildere Elutionsbedingungen als im Falle des denaturierenden Guanidiniumthiocyanates verwendet werden. Eine zweifache Inkubation der Spiegelmer-Neutravidin-Säule mit ddH<sub>2</sub>O, d. h. destilliertem Wasser, für 15 Minuten bei 55°C erwies sich als ebenso wirksam wie die Elution mit Guanidiniumthiocyanat. Dieses Elutionsverfahren erlaubt eine Elution, bei der die das Zielmolekül bindende, ein Spiegelmer umfassende Matrix wiederverwertbar ist. Dieses spezifische Elutionsverfahren wurde in weitergehenden Experimenten auch bei Verwendung von Sephadex als Matrix erfolgreich praktiziert.

Als zusätzlicher Beleg wurde doppelt gereinigtes GnRH mit 4 pmol nicht markiertem GnRH versetzt und die Inkubation auf der Spiegelmer-Matrix, wie in den Beispielen beschrieben, durchgeführt. In diesem Falle konnten 89 % der hinzugegebenen Radioaktivität zurückgehalten und - unter Denaturierung - von der Spiegelmer-Sepharose-Säule eluiert werden. Bei Verwendung der derivatisierten CPG 3000 Matrix wurden 73 % zurückgehalten. Das Ergebnis ist auch in Fig. 7 dargestellt, wobei Fraktion 1 den Durchfluss, die Fraktionen 2 bis 8 die Waschfraktionen und die Fraktionen 10 bis 13 die Elution unter Denaturierung darstellen. Der Wert von Fraktion 14 ist derjenige der festen Phase.

Hinsichtlich der Verwendung von funktionalen Nukleinsäuren, insbesondere Spiegelmeren, lässt sich somit festhalten, dass sowohl ein kovalentes wie auch nicht-kovalentes Binden an Matrices möglich ist und eine Verwendung als Affinitätsmatrix somit möglich wurde. Es besteht grundsätzlich kein Unterschied hinsichtlich des Adsorptionsverhaltens zwischen nicht-kovalent (Neutravidin-Agarose) und kovalent (Sepharose) immobilisiertem Spiegelmer. Die Bindungsstudie von L-DNA mit unaufgereinigtem <sup>3</sup>H-GnRH-Präparat zeigte, dass maximal 41 % der Mischung an hohe Spiegelmer-Konzentrationen (bis zu 10 µM) binden. Im Gegensatz dazu wurden nur 34 % der Mischung auf der Spiegelmer-Neutravidin- und der Spiegelmer-Sepharose-Säule zurückgehalten. Dies zeigt an, dass über 80 % des GnRH adsorbiert werden konnten. Die Bestimmung der Kapazität zeigte, dass 50 % des immobilisierten Spiegelmers korrekt gefaltet ist und GnRH bindet (siehe Beispiel 6).

Die hierin offenbarten kovalent immobilisierten L-DNA-Liganden stellen das erste Beispiel dar für eine Nukleinsäure-basierte Affinitätsmatrix, die in biologischen Flüssigkeiten hochstabil ist. Die entsprechenden Systeme aus dem Stand der Technik weisen diese biologische Stabilität nicht auf.

Die Offenbarung der verschiedenen hierin zitierten Literaturstellen wird hiermit durch Bezugnahme aufgenommen.

Die in der vorstehende Beschreibung, in den Figuren und dem Sequenzprotokoll sowie den Ansprüchen offenbarten Merkmale der Erfindung können sowohl einzeln als auch in beliebigen Kombinationen für die Verwirklichung der Erfindung in ihren verschiedenen Ausführungsformen wesentlich sein.

Ansprüche

1. Immobilisierte Nukleinsäure umfassend eine Nukleinsäure und eine Matrix, wobei die Nukleinsäure ein Spiegelmer ist und das Spiegelmer funktional aktiv ist.
2. Immobilisierte Nukleinsäure nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Spiegelmer über sein 3'-Ende an die Matrix gebunden ist.
3. Immobilisierte Nukleinsäure nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Spiegelmer über sein 5'-Ende an die Matrix gebunden ist.
4. Immobilisierte Nukleinsäure umfassend eine Nukleinsäure und eine Matrix, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäure über ihr 3'-Ende an die Matrix gebunden ist und die Nukleinsäure eine funktionale Nukleinsäure ist.
5. Immobilisierte Nukleinsäure nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass die funktionale Nukleinsäure ein Aptamer ist.
6. Immobilisierte Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäure zusätzlich zur Bindung über ihr 3'-Ende oder ihr 5'-Ende über mindestens eine weitere Stelle an die Matrix gebunden ist.
7. Immobilisierte Nukleinsäure nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die weitere Stelle das 5'-Ende der Nukleinsäure ist.
8. Immobilisierte Nukleinsäure nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die weitere Stelle eine Stelle innerhalb der Sequenz der Nukleinsäure ist.
9. Immobilisierte Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 6 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäure an die Matrix gebunden ist über ihr 3'-Ende und ihr 5'-Ende und darüber hinaus noch über mindestens eine Stelle innerhalb der Sequenz der Nukleinsäure.



10. Immobilisierte Nukleinsäure nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäure an ihrem 5'-Ende modifiziert ist.
11. Immobilisierte Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäure Nukleotide umfasst, die ausgewählt sind aus der Gruppe, die D-Nukleotide, L-Nukleotide, modifizierte D-Nukleotide und modifizierte L-Nukleotide sowie Mischungen davon umfasst.
12. Immobilisierte Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäure direkt an die Matrix gebunden ist.
13. Immobilisierte Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäure über eine Linkerstruktur an die Matrix gebunden ist.
14. Immobilisierte Nukleinsäure nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Linkerstruktur sowohl an das 3'- als auch das 5'-Ende der Nukleinsäure gebunden ist und die Linkerstruktur an die Matrix gebunden ist.
15. Immobilisierte Nukleinsäure nach Anspruch 13 oder 14, dadurch gekennzeichnet, dass die Linkerstruktur ein Spacer ist, wobei der Spacer bevorzugt mindestens vier Atome umfasst, die ausgewählt sind aus der Gruppe, die C-Atome und Heteroatome umfasst.
16. Immobilisierte Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass die für die direkte oder indirekte Bindung der Nukleinsäure an die Matrix verwendete Struktur der Nukleinsäure ausgewählt ist aus der Gruppe, die den Zuckeranteil des Zucker-Phosphat-Rückgrats, den Phosphatteil des Zucker-Phosphat-Rückgrats und den Basenanteil der die Nukleinsäure ausbildenden Nukleotide umfasst.
17. Immobilisierte Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass die Bindung ausgewählt ist aus der Gruppe, die kovalente Bindung, nicht-kovalente Bindung, insbesondere Wasserstoffbrückenbindung, van der Waals-

Wechselwirkungen, Coulomb-Wechselwirkung und/oder hydrophobe Wechselwirkung; koordinative Bindung; und Kombinationen umfasst.

18. Immobilisierte Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass die Matrix eine feste Phase ist.
19. Immobilisierte Nukleinsäure nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass die feste Phase ein Material umfasst, das aus der Gruppe ausgewählt ist, die organische und anorganische Polymere umfasst.
20. Immobilisierte Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäure eine Mindestlänge aufweist, wobei die Mindestlänge ausgewählt ist aus der Gruppe, die Mindestlängen von 15 Nukleotiden, 20 Nukleotiden, 25 Nukleotiden, 30 Nukleotiden, 35 Nukleotiden, 40 Nukleotiden, 50 Nukleotiden, 60 Nukleotiden, 90 Nukleotiden und 100 Nukleotiden umfasst.
21. Immobilisierte Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 20, dadurch gekennzeichnet, dass die Matrix ausgewählt ist aus der Gruppe, die CPG, Sepharose, Agarose, Eupergit und Polystyrol umfasst.
22. Immobilisierte Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 21, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäure eine Sequenz nach SEQ ID No. 2 umfasst.
23. Verwendung einer immobilisierten Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 22 zur Apherese.
24. Verwendung einer immobilisierten Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 22 als Affinitätsmedium, bevorzugterweise zur Affinitätsreinigung.
25. Apherese-Vorrichtung umfassend eine immobilisierte Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 22.

26. Verfahren zur Herstellung einer immobilisierten Nukleinsäure, insbesondere nach einem der Ansprüche 1 bis 22, gekennzeichnet durch die folgenden Schritte:
- Bereitstellen einer Nukleinsäure und einer Matrix, und
  - Umsetzen der Nukleinsäure und der Matrix zur Ausbildung einer Bindung des 3'-Endes und/oder des 5'-Endes der Nukleinsäure an die Matrix.
27. Verfahren zur Herstellung einer immobilisierten Nukleinsäure, insbesondere nach einem der Ansprüche 1 bis 22, gekennzeichnet durch die folgenden Schritte:
- Bereitstellen einer Nukleinsäure und einer Matrix, und
  - Umsetzen der Nukleinsäure und der Matrix zur Ausbildung einer Bindung des 3'-Endes und 5'-Endes der Nukleinsäure an die Matrix.
28. Verfahren nach Anspruch 26 oder 27, dadurch gekennzeichnet, dass das Verfahren den weiteren Schritt umfasst:
- Modifizieren der Nukleinsäure an ihrem 5'-Ende vor der Umsetzung.
29. Verfahren nach Anspruch 26 oder 27, dadurch gekennzeichnet, dass das Verfahren den weiteren Schritt umfasst:
- Modifizieren der Nukleinsäure an ihrem 5'-Ende nach der Umsetzung.
30. Verfahren nach einem der Ansprüche 26 bis 29, dadurch gekennzeichnet, dass vor dem Umsetzen der Nukleinsäure und der Matrix die Nukleinsäure und/oder die Matrix aktiviert wird oder schon vorher aktiviert war.
31. Verfahren nach einem der Ansprüche 26 bis 30, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäure und/oder die Matrix vor oder während der Umsetzung mit einer Linkerstruktur oder einem Teil davon oder einem Spacer versehen wird/werden.

32. Verfahren zur Elution eines an eine Nukleinsäure, insbesondere eine immobilisierte Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 22, gebundenen Zielmoleküls, wobei die Elution unter Verwendung von destilliertem Wasser bei erhöhter Temperatur erfolgt.
33. Verfahren nach Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, dass die erhöhte Temperatur mindestens 45°C, bevorzugterweise mindestens 50°C und bevorzugterweise mindestens 55°C beträgt.
34. Verfahren zur Elution eines an eine immobilisierte Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 22 gebundenen Zielmoleküls, dadurch gekennzeichnet, dass die Elution eine denaturierende Elution ist.
35. Verfahren nach Anspruch 34, dadurch gekennzeichnet, dass die denaturierende Elution unter Verwendung einer Verbindung erfolgt, wobei die Verbindung ausgewählt ist aus der Gruppe, die Guanidiniumthiocyanat, Harnstoff, Guanidiniumhydrochlorid, Ethylendiamintetraacetat, Natriumhydroxid, und Kaliumhydroxid erfolgt.

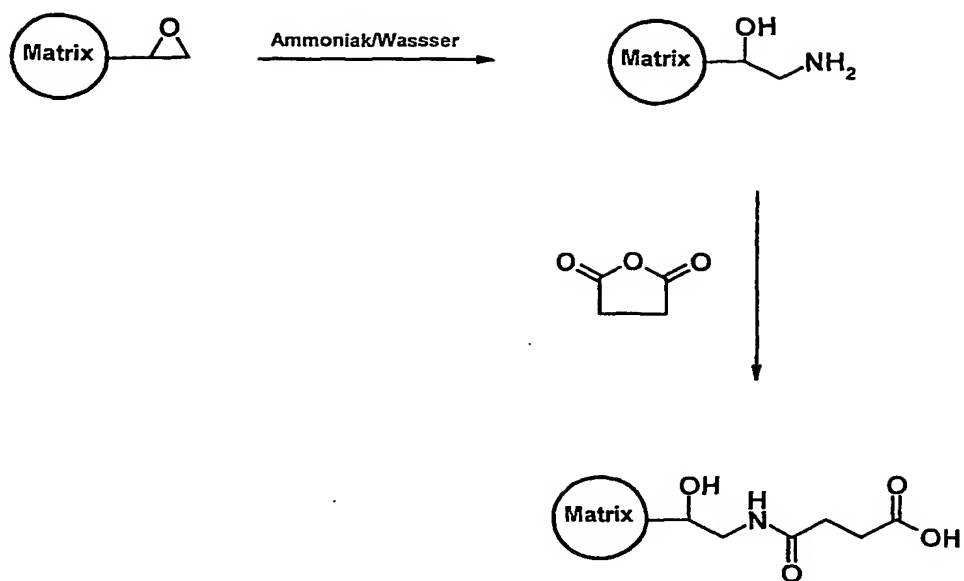


Fig.1

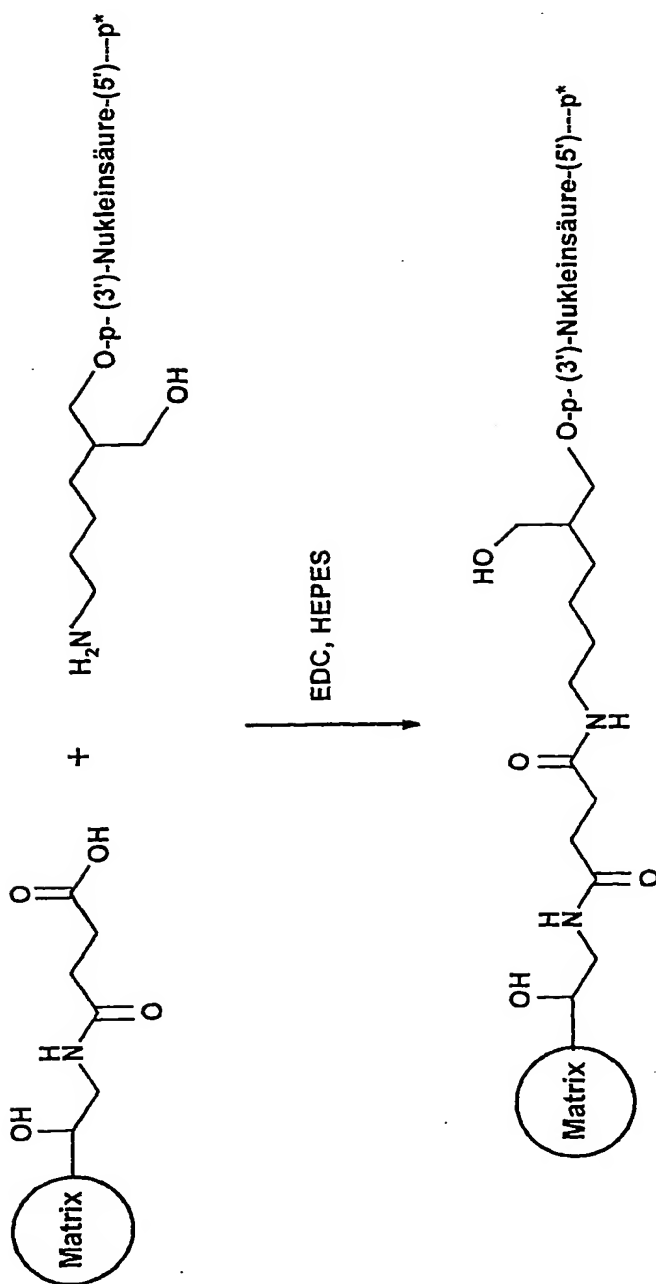


Fig.2

## Spiegelmer 1

(5'-GCG GCG GAG GGT GGG CTG GGG CTG GGC CGG GGG GCG TGC GTA  
AGC ACG TAG CCT CGC CGC-3')

## Spiegelmer 2

R2-(5'-GCG GCG GAG GGT GGG CTG GGG CTG GGC CGG  
GGG GCG TGC GTA AGC ACG TAG CCT CGC CGC-3')

## Spiegelmer 3

R3-(5'-GCG GCG GAG GGT GGG CTG GGG CTG GGC CGG  
GGG GCG TGC GTA AGC ACG TAG CCT CGC CGC-3')

## Spiegelmer 4

R4-(5'-GCG GCG GAG GGT GGG CTG GGG CTG GGC CGG  
GGG GCG TGC GTA AGC ACG TAG CCT CGC CGC-3')

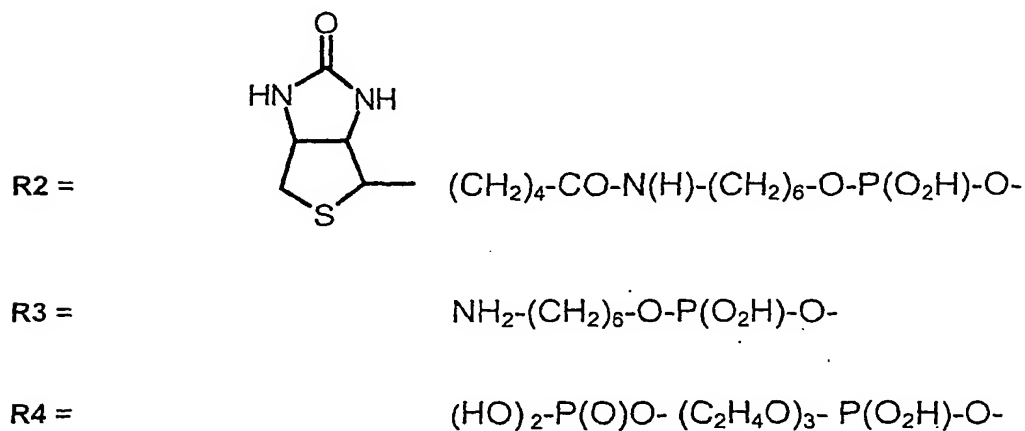


Fig.3

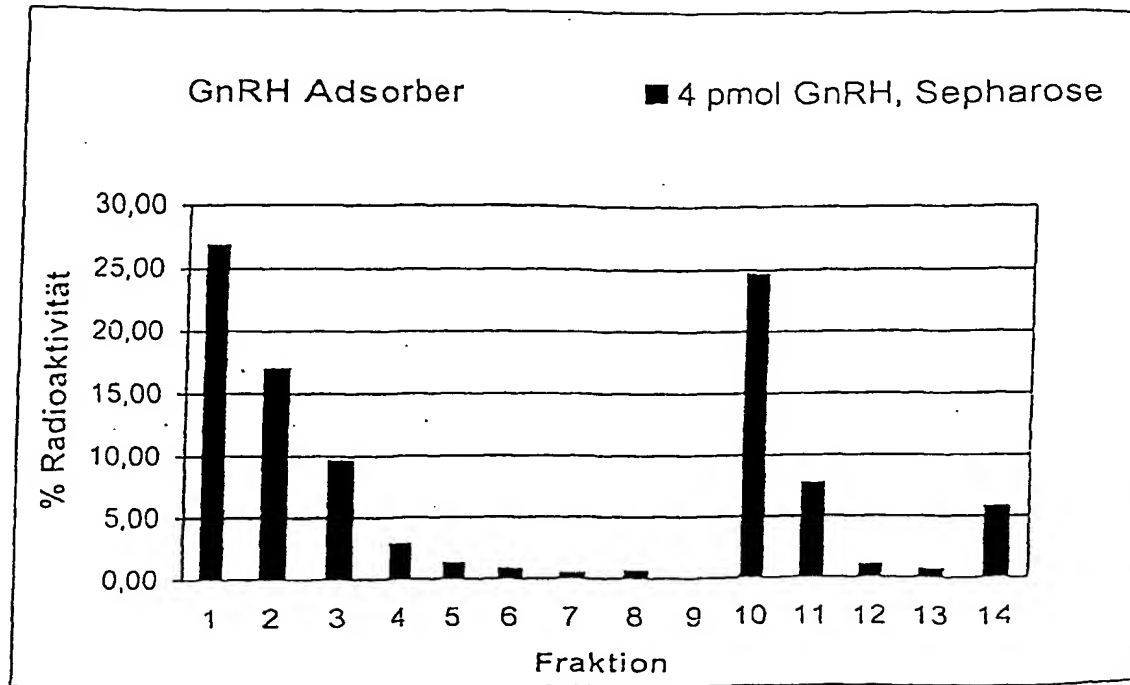


Fig. 4



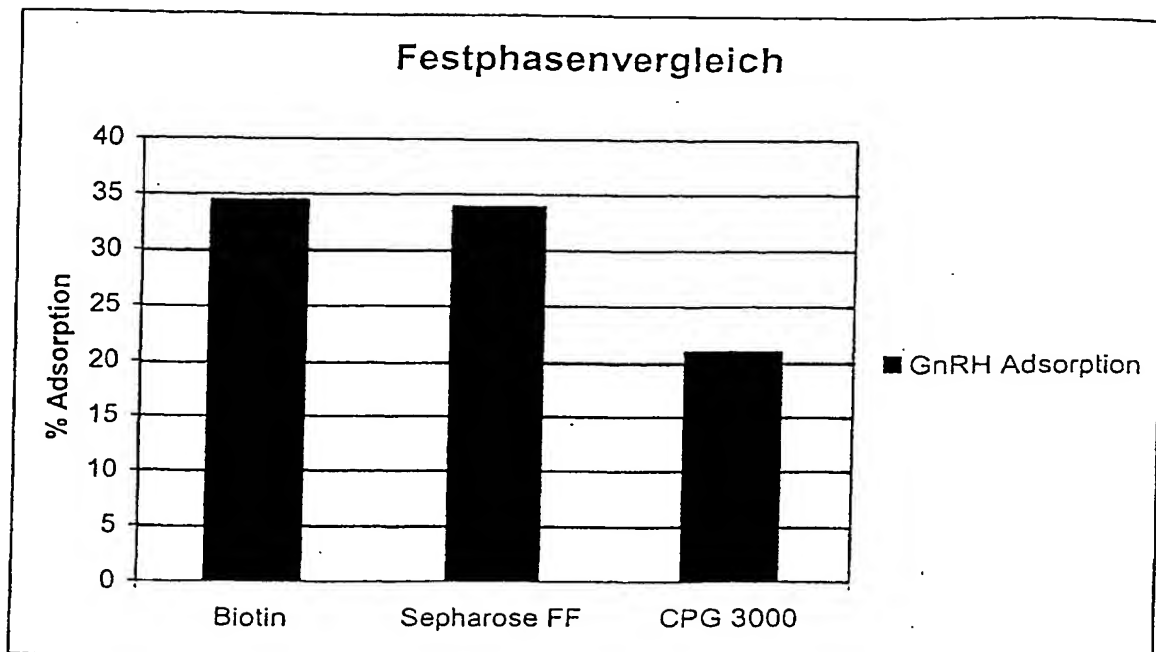


Fig. 5

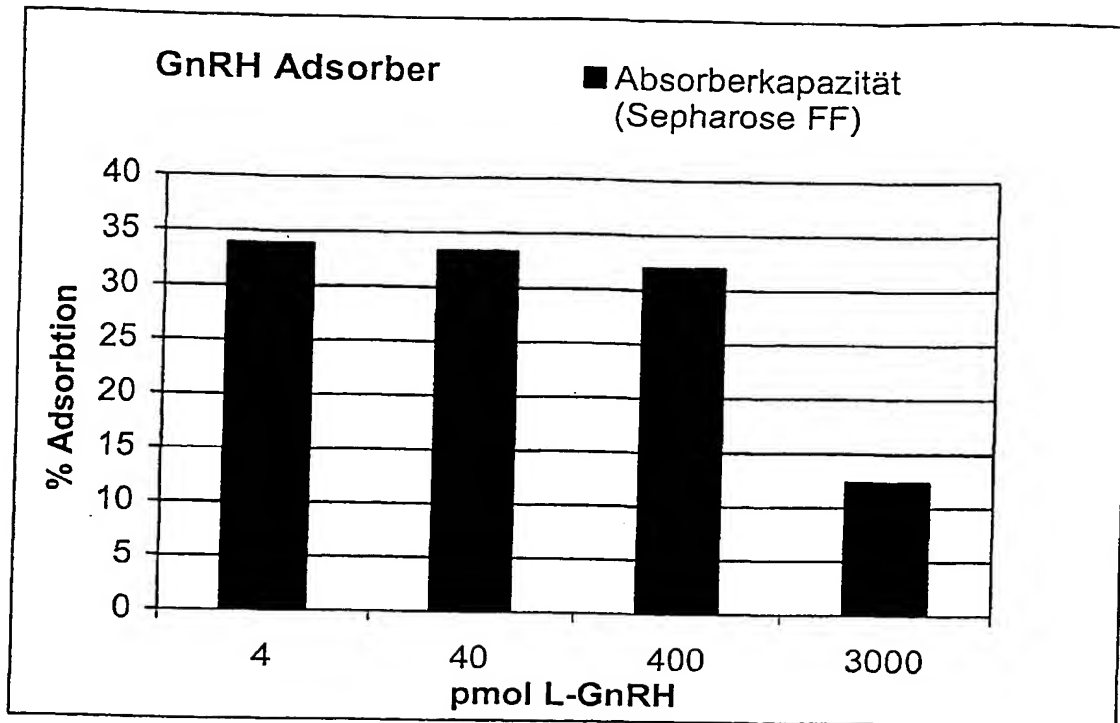


Fig. 6

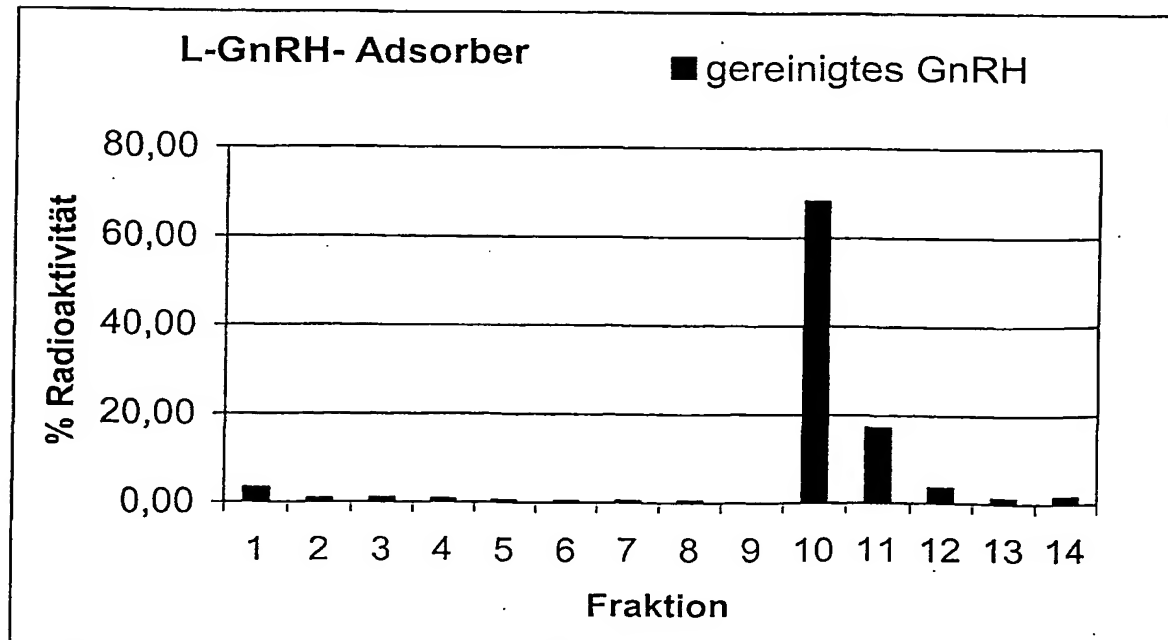
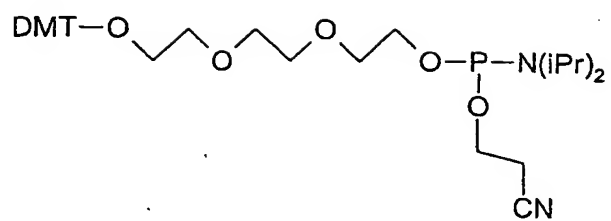
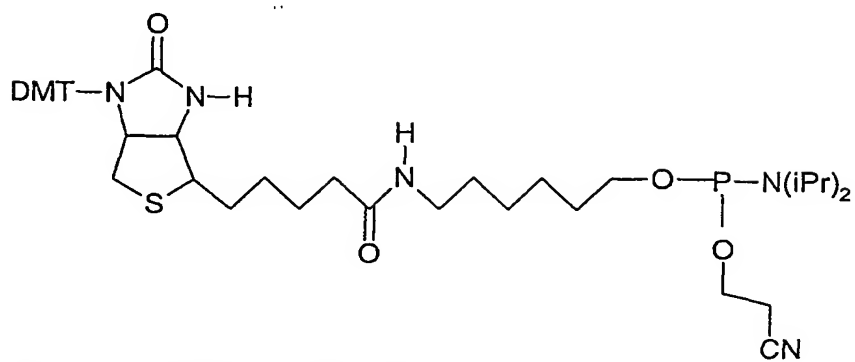


Fig. 7

Spacer 9



### Biotin Phosphoramidit



## Chemical Phosphorylation Reagent II

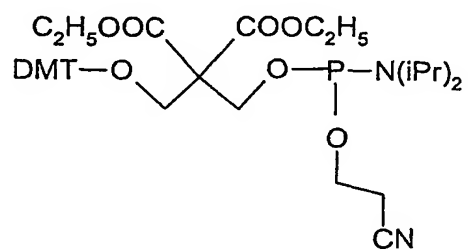


Fig. 8

## SEQUENZPROTOKOLL

<110> NOXXON Pharma AG

<120> Immobilisierte Nukleinsäuren und Verwendungen davon

<130> N10010PCT

<140>

<141>

<150> DE 100 26 300.3

<151> 2000-05-26

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> SITE

<222> (1)

<223> Glu ist Pyroglutamat

<220>

<221> SITE

<222> (10)

<223> Gly liegt NH2-modifiziert vor

<400> 1

Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly

1

5

10

<210> 2

<211> 60

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: GnRH  
bindende Nukleinsäuresequenz

<400> 2

gcggcggagg gtgggctggg gctgggccgg ggggcgtgcg taagcacgta gcctcgccgc 60

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**